



(51) МПК

[A61K 36/882 \(2006.01\)](#)[A61K 125/00 \(2006.01\)](#)[A61K 31/715 \(2006.01\)](#)[B01D 11/02 \(2006.01\)](#)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 18.05.2022)
 Пошлина: учтена за 9 год с 08.04.2022 по 07.04.2023. Установленный срок для уплаты пошлины за 10 год: с 08.04.2022 по 07.04.2023. При уплате пошлины за 10 год в дополнительный 6-месячный срок с 08.04.2023 по 07.10.2023 размер пошлины увеличивается на 50%.

(21)(22) Заявка: [2014113232/15](#), 07.04.2014(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.04.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.04.2014

(45) Опубликовано: [20.04.2015](#) Бюл. № 11

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске:

RU 2311918 C1, 10.12.2007 пар RU 2344829 C1,
27.01.2009 пар RU 2471496 C1, 10.01.2013

Адрес для переписки:

634050, г.Томск, Московский тракт, 2, ГБОУ
ВПО СибГМУ Минздрава России, отдел ИС и
В, Зубаревой Н.Г.

(72) Автор(ы):

Белоусов Михаил Валерьевич (RU),
Юсубов Мехман Сулейманович (RU),
Гурьев Артем Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования "Сибирский государственный
медицинский университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России)
(RU)(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-ГАЛАКТОПИРАНОЗИЛУРОНАНА ИЗ КОРНЕВИЩ *Acorus calamus* L.

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к способу получения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана. Способ получения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ *Acorus calamus* L. осуществляют в два этапа: на первом этапе измельченное сырье экстрагируют водой подкисленной и нагревают на кипящей водяной бане при периодическом перемешивании, после отстаивания смесь снова нагревают, оставляют для охлаждения до комнатной температуры и отфильтровывают через многослойный тканевый фильтр, фильтрат упаривают под вакуумом, полученный раствор медленно выливают в 96%-ный спирт этиловый или в раствор регенерированного этанола и оставляют в прохладном месте для отстаивания осадка, после чего отстоявшийся раствор сливают, а осадок отфильтровывают через бумажный фильтр, промывая последовательно 96%-ным спиртом этиловым, далее ацетоном, на втором этапе осадок, не высушивая, переносят с фильтра и растворяют в воде очищенной при быстром перемешивании, затем полученный раствор центрифугируют, полученный раствор очищают от низкомолекулярных соединений фильтрованием через полупроницаемую мембрану, далее очищенный раствор замораживают и лиофильно высушивают при определенных условиях. 3 ил., 6 табл.

Изобретение относится к области фармацевтической промышленности, к способам получения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ *Acorus calamus* L., который может быть использован в качестве средства для комплексной терапии злокачественных новообразований.

Известны средства, повышающие противоопухолевую и противометастатическую активность цитостатических препаратов [RU 2471496 C1, опубликовано 10.01.2013], представляющие собой полисахариды (галактозосодержащие пектины), выделенные из растительного сырья - корневищ аира болотного (*Acorus calamus* L.). Полисахарид $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронан обладает наиболее выраженной биологической активностью, среди описанных галактозосодержащих пектинов, и может быть использован для разработки нового лекарственного средства для комплексной терапии злокачественных новообразований. Вопрос выделения и очистки $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ *Acorus calamus* L. требует разработки новых технических подходов.

Известен способ получения из растительного сырья галактоуранонов, обладающих противовоспалительным действием [RU 2344829 C1, опубликовано 27.01.2009].

Способ получения из растительного сырья галактуронанов включает предварительную обработку сырья водным раствором формалина, выдерживание в подкисленной воде, экстракцию водным раствором оксалата аммония, центрифугирование экстракта, добавление HCl до определенного значения, выдерживание при определенных условиях, нейтрализацию, фильтрацию, концентрирование экстракта на ультрафильтрационной колонке и лиофильную сушку целевого продукта

Наиболее близким к предлагаемому является способ получения суммы водорастворимых полисахаридов из корневищ айра болотного (*Acorus calamus L.*) [RU 2311918 C1, опубликовано 10.12.2007]. Способ заключается в двукратной экстракции водой корневищ айра болотного, осаждении полисахаридов двукратным объемом 96% этанола, центрифугировании и высушивании. Средство обладает иммуностимулирующим действием. Недостатком способа является то, что отсутствовал этап выделения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из полученной суммы полисахаридов.

Технический результат изобретения заключается в получении целевого продукта с большей степенью очистки, увеличении выхода и расширении арсенала способов получения лекарственных средств из корневищ айра болотного.

Для достижения технического результата в способе получения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ *Acorus calamus L.*, включающем экстрагирование растительного сырья водой при нагревании с последующим осаждением 96% этанолом и фильтрацией, высушиванием осадка, на первом этапе измельченное до 3-7 мм сырье экстрагируют водой, подкисленной до pH 2,0-3,0 концентрированной хлористо-водородной кислотой, и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа при периодическом перемешивании, после 24-часового отстаивания смесь снова нагревают в течение 1 часа, оставляют для охлаждения до комнатной температуры и отфильтровывают через многослойный тканевый фильтр, фильтрат упаривают под вакуумом при температуре не более 50°C до 100 мл, полученный раствор медленно выливают в 300 мл 96%-ного спирта этилового или раствор регенерированного этанола с концентрацией не менее 60% при соотношении экстракт:этиловый спирт 1:3, соответственно, и оставляют в прохладном месте для отстаивания осадка на 24 часа, после чего отстоявшийся раствор сливают, а осадок отфильтровывают через бумажный фильтр, промывая последовательно 96%-ным спиртом этиловым, далее ацетоном, на втором этапе осадок, не высушивая, переносят с фильтра, растворяют в 100 мл воды очищенной при быстром перемешивании в течение 3 часов при комнатной температуре, затем полученный раствор центрифугируют в течение 30 мин при 5000 об/мин, затем полученный раствор очищают от низкомолекулярных соединений путем фильтрации через полупроницаемую мембрану с размером пор 5 кДа, далее очищенный раствор замораживают и лиофильно высушивают.

Новым в предлагаемом способе является то, что на первом этапе измельченное до 3-7 мм сырье экстрагируют водой, подкисленной до pH 2,0-3,0 концентрированной хлористо-водородной кислотой, и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа при периодическом перемешивании, после 24-часового отстаивания смесь снова нагревают в течение 1 часа, оставляют для охлаждения до комнатной температуры и отфильтровывают через многослойный тканевый фильтр, фильтрат упаривают под вакуумом при температуре не более 50°C до 100 мл, полученный раствор медленно выливают в 300 мл 96%-ного спирта этилового или раствор регенерированного этанола с концентрацией не менее 60% при соотношении экстракт:этиловый спирт 1:3 и оставляют в прохладном месте для отстаивания осадка на 24 часа, после чего отстоявшийся раствор сливают, а осадок отфильтровывают через бумажный фильтр, промывая последовательно 96%-ным спиртом этиловым, далее ацетоном, на втором этапе осадок, не высушивая, переносят с фильтра, растворяют в 100 мл воды очищенной при быстром перемешивании в течение 3 часов при комнатной температуре, затем полученный раствор центрифугируют в течение 30 мин при 5000 об/мин, затем полученный раствор очищают от низкомолекулярных соединений путем фильтрования через полупроницаемую мембрану с размером пор 5 кДа, далее очищенный раствор замораживают и лиофильно высушивают.

Новый способ получения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ *Acorus calamus L.* был основан на результатах экспериментальных исследований.

Новый способ получения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ *Acorus calamus L.* для специалиста явным образом не вытекает из уровня техники и описание его не обнаружено авторами в патентной и научно-медицинской литературе. Предлагаемый способ апробирован в лабораторных условиях. Таким образом, предлагаемое техническое решение соответствует критериям изобретения, а именно «новизна», «изобретательский уровень» и «промышленная применимость».

Способ осуществляют следующим образом

1 стадия. Навеску сырья корневищ *Acorus calamus* L. с величиной частиц 3-7 мм (20,0 г) заливают раствором 400 мл воды очищенной и 2 мл концентрированной кислоты хлористо-водородной (рН 2,0-3,0) и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа при периодическом перемешивании. После 24-часового отстаивания смесь снова нагревают в течение 1 часа, оставляют для охлаждения до комнатной температуры и отфильтровывают через многослойный тканевый фильтр. Фильтрат упаривают под вакуумом при температуре не более 50°C до 100 мл. Полученный раствор медленно выливают в 300 мл 96%-ного спирта этилового или раствор регенерированного этанола с концентрацией 60% и более и оставляют в прохладном месте для отстаивания осадка на 24 часа. Отстоявшийся раствор сливают, а осадок отфильтровывают через бумажный фильтр, промывая последовательно 96%-ным спиртом этиловым, далее ацетоном.

2 стадия. Осадок, не высушивая, переносят с фильтра в стеклянный стакан и растворяют в 100 мл воды очищенной при быстром перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 часов при комнатной температуре. Затем полученный раствор центрифугируют (5000 об/мин - 30 мин - раствор должен быть прозрачным и не содержать мути). После центрифугирования полученный раствор очищают от низкомолекулярных соединений путем фильтрования через полупроницаемую мембрану с размером пор 5 кДа, очищенный раствор замораживают и лиофильно высушивают.

Химическую структуру выделенного полисахарида устанавливали методами хромато-масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии (Фигуры 1 и 2).

Качество конечного продукта определяли по молекулярно-массовому распределению (методом эксклюзионной хроматографии), содержанию уроновых кислот (спектрофотометрическим методом) и содержанию примесей белка (методом Лоури).

Определение молекулярно-массового распределения

Молекулярно-массовое распределение (ММР) характеризует степень однородности полимерного вещества - зависимость распределения среднечисловой молекулярной массы от относительного содержания в веществе. Было использовано рефрактометрическое детектирование, основанное на способности $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана преломлять проходящий свет.

Хроматографирование проводилось на хроматографической системе Ultimate 3000 («Dionex», Германия), оснащенной плунжерным насосом со скоростью подачи элюента 0,1-5 мл/мин, держателем колонок, рефрактометрическим детектором. Условия хроматографирования подбирались эмпирически: колонка - TSK GMPW_{XL}, 300*78 mm, 13 μ m; скорость потока элюента (вода) - 1 мл/мин; температура колонки - 25°C; температура ячейки детектора - 40°C.

Анализ конечного продукта $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. показал, что содержание высокомолекулярной фракции ≥ 5 кДа составляет не менее 99%.

Определение содержания уроновых кислот

Содержание уроновых кислот определяли карбазол-серным методом (модифицированным добавлением сульфаминовой кислоты), адаптированным для $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. в пересчете на галактуроновою кислоту с использованием спектрофотометрии. Оптическую плотность исследуемого раствора определяли при длине волны 535 нм.

Раствором сравнения служила смесь кислоты серной с натрия тетраборатом (1500 мкл), водой очищенной (250 мкл), кислотой сульфаминовой (10 мкл) и карбазолом (50 мкл).

По градуировочной кривой, построенной по галактуроновою кислоте, находили ее содержание (в %) по оптической плотности пробы.

Расчеты проводили по формуле (1)

$$C_x = \frac{A_x \cdot V \cdot m}{A_{std} \cdot V_{std} \cdot m_{std}}$$

C_x - количество уроновых кислот, найденное по градуировочному графику, мг/мл; 1, 1,81 - разведения; 0,05 - объем анализируемого раствора, взятый для анализа, мл; 0,0010 - точная масса ПСК, г; 1000 - перевод г в мг.

Целевой продукт - $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранан *Acorus calamus* L. должен содержать не менее 20,0% галактуроновою кислоты.

Определение содержания примесей белка

Несмотря на несколько стадий очистки при получении $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. в его составе могут присутствовать вещества белковой природы, обладающие схожими физико-химическими свойствами с полисахаридами. В ГФ XII приведено несколько методик по определению содержания белка, наибольшее распространение получили методы Лоури и Бредфорда. Последний применяется реже, т.к. имеет ряд недостатков: специфичность

к положительным аминокислотам, что приводит, иногда, к систематической погрешности и завышенному показателю содержания белка; реактив Кумасси G250 не стабилен в растворе, что приводит к необходимости при очередном анализе готовить серию стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина и проводить калибровку. Поэтому был выбран метод Лоури в качестве рабочего метода определения примеси белка в $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронане *Asogus salamus* L. Анализ показал незначительное содержание белка - не более 1,8%.

Новый способ получения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ *Asogus salamus* L. был основан на результатах экспериментальных исследований.

Обоснование режима способа

1. Исследование параметров экстрагирования.

Промежуточным продуктом для получения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Asogus salamus* L. является комплекс водорастворимых полисахаридов (ВРПС) из корневищ айра болотного, поэтому на первом этапе для отработки оптимальных технологических параметров способа получения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Asogus salamus* L. с целью повышения выхода конечного продукта были определены оптимальные параметры экстрагирования комплекса ВРПС из сырья в их взаимосвязи.

В эксперименте изучали влияние на выход комплекса ВРПС таких параметров как:

- размер частиц сырья;
- рН экстрагента (регулируемая кислотой хлороводородной);
- время нагревания на водяной бане.

Для исследования размера частиц исходное сырье корневищ айра болотного разделили ситовым методом на фракции по размеру частиц сырья. Использовали набор сит с отверстиями диаметром от 1 до 7 мм. После просеивания сырья получили фракции с различными размерами частиц: 1,0-2,0 мм; 2,0-3,0 мм; 3,0-5,0 мм; 5,0-7,0 мм.

Для исследования влияния рН среды на экстракцию комплекса ВРПС из корневищ айра болотного использовали водные растворы, подкисленные хлористо-водородной кислотой до рН=2,0; 2,5; 3,0; 3,5.

Использование подкисленного экстрагента для выделения полисахаридного комплекса (ПСК) из корневищ айра болотного обусловлено природой действующих веществ. В растительном сырье часть полисахаридов (ПС) находится в виде солей, которые не растворимы в водных растворах. Поэтому для повышения растворимости ПС в экстрагент добавляют хлористо-водородную кислоту, слабые концентрации которой способствуют разрушению солей ПС и переходу их в раствор.

Исследование влияния времени нагревания на водяной бане обусловлено тем, что количество извлеченных веществ из растительного сырья пропорционально продолжительности экстракции. По мере удлинения времени качественный состав вытяжки ухудшается из-за насыщенности балластными веществами. Поэтому необходимо стремиться к тому, чтобы полнота извлечения была достигнута в кратчайший срок, т.к. о качестве процесса извлечения правильно судить не по сумме извлекаемых веществ, а по компонентному составу продукта. Исследовали время экстракции: 20; 40; 60 и 80 мин.

Для уменьшения объема исследований использовали метод математического моделирования на основе греко-латинского квадрата. Анализ результатов эксперимента выполняли с помощью пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0». Факторы, влияющие на процесс выхода комплекса ВРПС, представлены в таблице 1. Планы составляли таким образом, чтобы каждый уровень фактора единожды присутствовал в каждой строке (столбце) плана, а каждое сочетание уровней факторов встречалось только один раз.

Критериями оптимизации являлись: выход комплекса ВРПС и выход кислых полисахаридов. Для оценки значимости приведенных факторов по плану эксперимента проведено 16 опытов в условиях, регламентированных матрицей планирования. Результаты эксперимента подвергали дисперсионному анализу. Однородность дисперсии проверяли с помощью F критерия Фишера с учетом числа степеней свободы. Матрица планирования эксперимента и результаты исследований представлены в таблице 2.

Анализ полученных данных позволил выявить факторы, оказывающие существенное влияние на процесс выхода полисахаридов из сырья (таблица 3).

Полученные данные позволили рассчитать для содержания комплекса ВРПС в сырье сумму квадратов отклонений от среднего значения, вызываемых воздействием на данный показатель, и отобразить уровень влияния факторов в %:

- контролируемых факторов $SS_I = SS_A + SS_B + SS_C = 13,10245$;
- неконтролируемых случайных факторов и ошибок измерений $SS_{II} = 3,21495$;
- всего $SS = SS_I + SS_{II} = 16,31740$.

Величина степени влияния каждого из факторов составляла $K_A = 8,49\%$; $K_B = 64,24\%$; $K_C = 7,56\%$; в целом контролируемых факторов - $K_I = 80,3\%$; неконтролируемых

случайных факторов и ошибок измерений - $K_{II}=19,7\%$.

Следовательно, наибольшее влияние на выход ПСК оказывал фактор В - рН экстрагента, факторы А (размер частиц) и С (время нагревания) не продемонстрировали значительного влияния на выход ПСК.

Сумма квадратов отклонений при анализе факторов на выход кислых полисахаридов (КП) равнялась $SS_I - 0,23795$, $SS_{II} - 0,12096$ и $SS - 0,35891$.

Наибольшее влияние на процесс выделения КП оказал фактор В - рН экстрагента ($K_B=36,53\%$). Размер частиц и время нагревания в незначительной степени повлияли на выход КП из растительного сырья ($K_A=22,22$ и $K_C=7,55\%$). На долю неконтролируемых случайных факторов приходилось $33,7\%$.

Таким образом, установлено, что наиболее интенсивно эффективность экстракции полисахаридов возрастает при уменьшении рН среды.

Для оценки параметров внутри факторов рассчитывали средние значения и отклонения для каждого параметра (таблица 4).

Полученные данные показывают, что с увеличением размера частиц сырья от 1 мм до 7 мм выход комплекса ВРПС увеличивался. Для растительного сырья с размером частиц 2-3 мм, 3-5 мм и 5-7 мм эти показатели отличались незначительно, в пределах ошибки. При изменении рН экстрагента от 3,0 до 2,0 выход комплекса ВРПС достоверно возрастал. Время экстракции не оказывало существенного влияния на выход полисахаридов и по полученным данным нельзя достоверно судить, какое время экстракции является оптимальным.

Определение КП показывает, что их выход увеличивается при увеличении размера частиц сырья и изменении рН экстрагента в кислую сторону. Наибольший выход КП наблюдался при рН 2,0 и размере частиц 3-7 мм. Время экстракции не оказывает существенного влияния на выход кислых полисахаридов. Ни один из факторов не оказывает достоверного влияния на выход КП.

Полученные в ходе анализа результаты свидетельствуют, что степень измельчения исходного сырья и время экстракции оказывают незначительное влияние на экстрагирование полисахаридов из корневищ аира болотного, а рН экстрагента является значимым фактором для выхода комплекса ВРПС.

Таким образом были определены:

- размер частиц сырья - 3-7 мм;
- рН экстрагента (регулировалась кислотой хлороводородной) - рН=2,0;
- время нагревания на водяной бане - 1 час.

2. Исследование условий упаривания извлечения.

Для выбора рабочих условий упаривания экстракта на роторном испарителе была поставлена серия экспериментов по варьированию технологических параметров упаривания. Полученные данные представлены в таблице 5.

Как видно из таблицы 5, наименьшее время упаривания достигается следующими параметрами роторного испарителя: температура водяной бани 50°C , скорость вращения испарительной колбы 40 об/мин, температура теплоносителя в холодильнике $2-5^{\circ}\text{C}$ и давление в системе 30 мбар. Эти условия были выбраны нами в качестве рабочих параметров на стадии упаривания водного извлечения.

3. Исследование влияния концентрации этилового спирта на осаждение полисахаридного комплекса этанолом.

На стадии осаждения полисахаридного комплекса этиловым спиртом остается большое количество водно-этанольного раствора, содержащего 45-70% этилового спирта. Данный отход возможно регенерировать путем перегонки на роторном испарителе до концентрации этилового спирта 60-80% и использовать повторно для осаждения полисахаридного комплекса из водного извлечения, что приведет к удешевлению продукта и снижению количества опасных отходов производства. Возможностью использования регенератов с содержанием этилового спирта 60-80% потребовала проведения дополнительных экспериментальных исследований влияния различных концентраций этилового спирта (60, 65, 70, 75, 80 и 96%) на выход и показатели качества $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L.

Полученные данные по концентрации этилового спирта, соотношению экстракта и осаждающего агента, полученному осадку, содержанию галактуроносовой кислоты и выходу отражены в таблице 6.

Из таблицы видно, что концентрация этилового спирта влияет на плотность осадка, полученный осадок во всех случаях был однородным, но разного объема, массы, цвета и консистенции. При повышении концентрации этилового спирта осадок становился более густым, происходит более сильное обезвоживание осадка при одновременном уменьшении веса.

Соотношение экстракта и этилового спирта влияло на выход продукта, при соотношении 1:2 выход продукта уменьшался.

Ни концентрация этанола, ни соотношение экстракта и осаждающего агента не влияли на содержание галактуроносовой кислоты в целевом продукте.

Таким образом, в качестве оптимального режима осаждения целесообразно использовать регенерированный этиловый спирт с крепостью 60% и более в соотношении 1:3.

4. Использование центрифугирования для очистки полисахаридного комплекса.

При дальнейшей разработке способа получения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. было отмечено выпадение осадка в полуфабрикатах при хранении в холодильнике ($5\pm 3^\circ\text{C}$). Осадок рыхлый белого цвета, надосадочная жидкость мутная. При исследовании технологических параметров, используемых при получении, выяснено, что появление осадка связано с длительностью стадии фильтрации полисахаридного комплекса. За время фильтрации раствор нагревается до комнатной температуры, в результате в раствор переходят водорастворимые фракции крахмала и других полисахаридов, которые при последующем охлаждении выпадают в осадок.

Проблема решается путем введения стадии центрифугирования, позволяющей сократить время стадии и проводить очистку в режиме охлаждения с использованием рефрижераторной центрифуги. Для изучения возможности использования центрифугирования были проведены дополнительные исследования.

Для решения данной технологической проблемы целесообразно использовать центрифугирование при скорости 5000 об/мин, охлаждении рабочей камеры центрифуги до $+5^\circ\text{C}$.

5. Использование фильтрации через полупроницаемую мембрану для очистки полисахаридного комплекса.

На стадии очистки раствор ВРПС подвергают промыванию органическими растворителями, но даже небольшие остаточные количества растворителей могут отрицательно сказываться на качестве целевого продукта. Для того чтобы очистить получаемый продукт от органических растворителей и низкомолекулярных примесей используют диализ полуфабриката через полупроницаемую мембрану с диаметром пор 5000 дальтон.

Для подтверждения эффективности фильтрации, как способа очистки, определяли компонентный состав субстанции с помощью метода ВЭЖХ.

Молекулярная масса полисахаридов, входящих в состав исследуемых образцов, устанавливалась по времени удерживания в соответствии с калибровочными значениями, выявленными по стандартным образцам декстранов.

Из хроматограммы (Фиг.3) видно, что предложенная технология позволяет извлечь полисахариды с нужной молекулярной массой. Представленные пики А и Б с временами удерживания 4,580 мин и 6,205 мин соответствуют молекулярным массам 380 и 720 кДа. Также на хроматограмме мы видим отсутствие низкомолекулярных примесей, что подтверждает эффективность использованного метода очистки.

Таким образом, экспериментально определены параметры способа получения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ *Acorus calamus* L.:

- размер частиц сырья - 3-7 мм;
- рН экстрагента (регулировалась кислотой хлороводородной) - рН 2,0;
- время нагревания на водяной бане - 1 час;
- условия упаривания: температура водяной бани 50°C , скорость вращения испарительной колбы 40 об/мин, температура теплоносителя в холодильнике $2-5^\circ\text{C}$ и давление в системе 30 мбар;
- для осаждения целесообразно использовать регенерированный этиловый спирт с крепостью 60% и более в соотношении экстракт:эстрагент 1:3;
- центрифугирование в течение 30 мин при скорости 5000 об/мин, охлаждении рабочей камеры центрифуги до $+5^\circ\text{C}$;
- для очистки целевого продукта - фильтрация полуфабриката через полупроницаемую мембрану с диаметром пор 5000 дальтон.

Приложение 1

Фигура 1 - Спектр ^{13}C -ЯМР $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L.

Фигура 2 - Спектр ^1H -ЯМР $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ *Acorus calamus* L.

Фигура 3 - Хроматограмма комплекса ВРПС из корневищ аира болотного.

Таблица 1 - Факторы, влияющие на процесс извлечения полисахаридов из корневищ аира болотного.

Таблица 2 - Трехфакторный симметричный дробный план второго порядка на основе латинского квадрата и результаты исследования полисахаридов из корневищ аира болотного.

Таблица 3 - Дисперсионный анализ результатов испытания полисахаридного комплекса, полученного из корневищ аира болотного.

Таблица 4 - Средние значения, отклонения от средних и средние квадратичные отклонения средних значений дробного плана на основе латинского квадрата.

Таблица 5 - Зависимость скорости упаривания 1 литра водного извлечения от

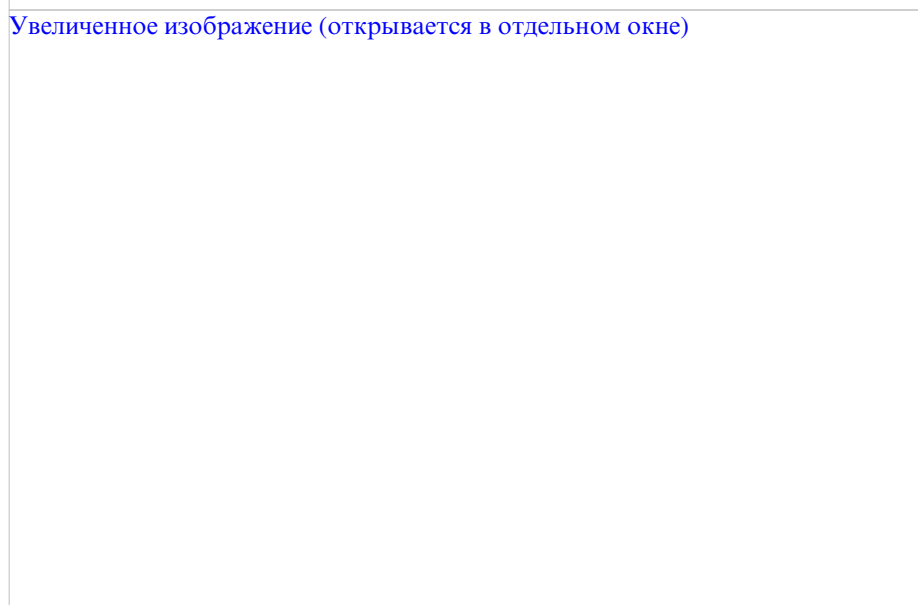
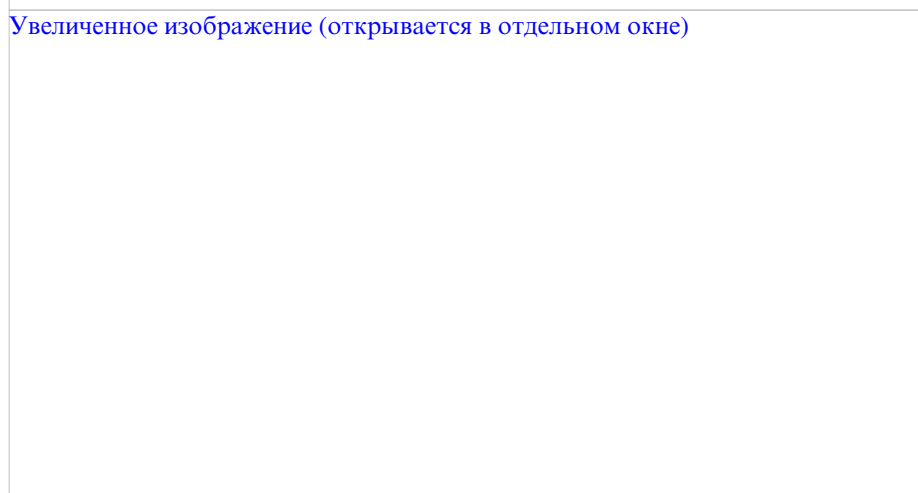
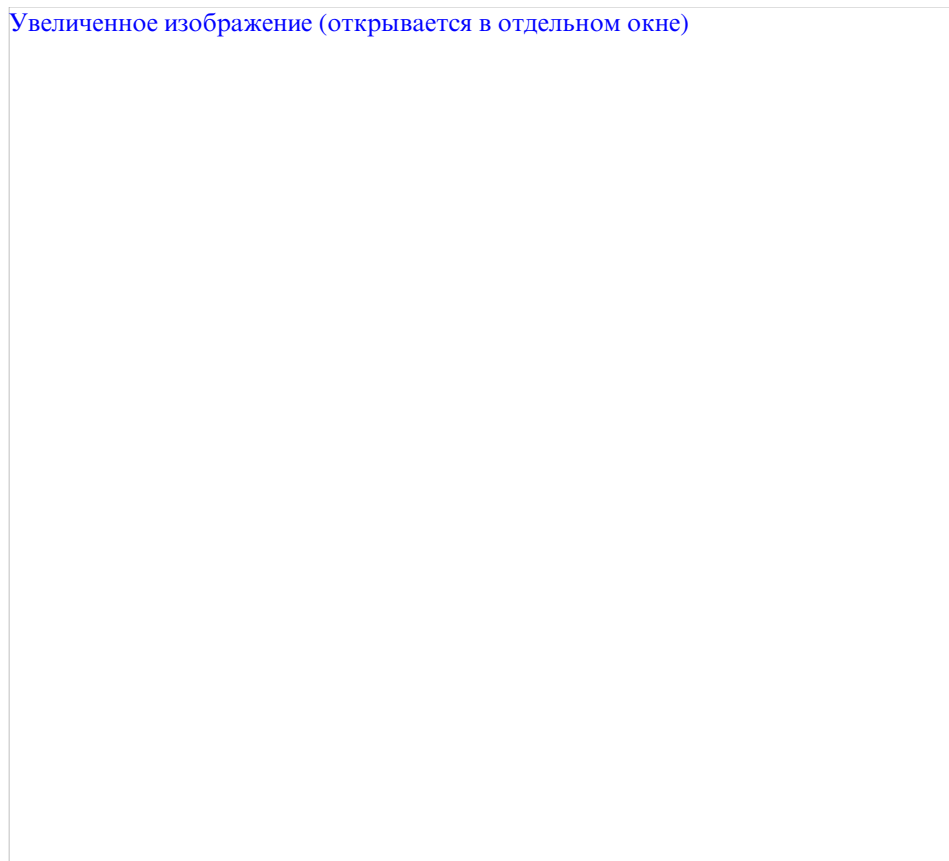
технологических параметров роторного испарителя.

Таблица 6 - Влияние различных концентраций этилового спирта при осаждении полисахаридного комплекса из упаренного водного извлечения корневищ *Acorus calamus* L. на выход и показатели качества $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L.

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)



Формула изобретения

Способ получения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана из корневищ *Asorus salatus* L., включающий экстрагирование растительного сырья водой при

нагревании с последующим осаждением 96% этанолом и фильтрацией, высушиванием осадка, отличающийся тем, что на первом этапе измельченное до 3-7 мм сырье экстрагируют водой, подкисленной до рН 2,0 концентрированной хлористоводородной кислотой, в соотношении растительного сырья и экстрагента 1:20 и нагревают на кипящей водяной бане в течение 1 часа при периодическом перемешивании, после 24-часового отстаивания смесь снова нагревают в течение 1 часа, оставляют для охлаждения до комнатной температуры и отфильтровывают через многослойный тканевый фильтр, фильтрат упаривают под вакуумом при температуре не более 50°C до 100 мл, полученный раствор медленно выливают в 96%-ный спирт этиловый или в раствор регенерированного этанола с концентрацией не менее 60% при соотношении экстракта и этилового спирта 1:3 и оставляют в прохладном месте для отстаивания осадка на 24 часа, после чего отстоявшийся раствор сливают, а осадок отфильтровывают через бумажный фильтр, промывая последовательно 96%-ным спиртом этиловым, далее ацетоном, на втором этапе осадок, не высушивая, переносят с фильтра, растворяют в 100 мл воды очищенной при быстром перемешивании в течение 3 часов при комнатной температуре, затем полученный раствор центрифугируют в течение 30 мин при 5000 об/мин и охлаждении рабочей камеры центрифуги до +5°C, затем полученный раствор очищают от низкомолекулярных соединений фильтрованием через полупроницаемую мембрану с размером пор 5 кДа, далее очищенный раствор замораживают и лиофильно высушивают.

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)



[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)



