

УДК 57.013:57.044

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО СЫРЬЯ

¹Салова Т.Ю., ²Громова Н.Ю.

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный аграрный университет»,
Санкт-Петербург, e-mail: salova_tus@mail.ru;

²ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», Тверь, e-mail: gnug@mail.ru

Предложена методология получения биологически активных веществ из растительного и животного сырья, основанная на принципах исследования химического строения предшественника биологически активных веществ, физико-химических свойств растворов, теоретических основ экстракции (распределения веществ между двумя несмешивающимися растворителями), механизма биосинтеза и действия на живой организм, отсутствия в них токсичных примесей. Используя эту методологию, можно обосновать гипотезу механизма выделения инсулина указанным способом, который основан на денатурации в кислой среде белково-пептидной структуры гормона, деструкции белково-пептидной связи и повышении растворимости белка и липидов в полярном растворителе (спиртах). Оптимальный состав растворителя и высаливателя необходимо осуществлять с помощью изучения фазовых равновесий и изменению физико-химических свойств от состава.

Ключевые слова: биологически активные вещества, методология, экстракция, растительное и животное сырье

THEORETICAL ASPECTS OF OBTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM PLANT AND ANIMAL MATERIALS

¹Salova T.Y., ²Gromova N.Y.

¹St. Petersburg State Agrarian University, St. Petersburg, e-mail: salova_tus@mail.ru;

²Tver State Technical University, Tver, e-mail: gnug@mail.ru

The methodology of production of biologically active substances from plant and animal raw materials, based on the principles of the study of the chemical structure of the precursor of the biologically active substances, physico-chemical properties of the solutions of the theoretical foundations of extraction (the distribution of substances between two immiscible solvents) biosynthesis and mechanism of action on the living organism, the absence of toxic contaminants. Using this methodology can justify the hypothesis of the mechanism of insulin release said method, which is based on the denaturation of the protein in an acidic environment, the peptide hormone structure, degradation of protein-peptide bond and increase protein solubility in lipids, and polar solvent (alcohols). The optimum composition of the solvent and the salting-out must be carried out with the study of phase equilibria and changes in physical and chemical properties of the composition.

Keywords: biologically active substances, methodology, extraction, vegetable and animal raw materials

Потребность в биологически активных веществах на современном этапе тесно связана с решением глобальных проблем интенсификации производства и экологическим оздоровлением окружающей среды, а именно: получение новых видов продуктов различного назначения и в первую очередь препаратов профилактического и терапевтического действия; утилизация отходов промышленности и сельского хозяйства; получение экологически безопасных средств защиты сельскохозяйственных растений от болезней, вредителей, сорных растений для повышения их биологической продуктивности. Разработка промышленной технологии производства биологически активных веществ из сырья природного происхождения позволяет осуществить комплексное использование биоресурсов. В настоящее время известен широкий спектр биологически активных веществ (БАВ) различного назначения, которые могут быть либо

получены из природных живых организмов, либо синтезированы с помощью различных химических превращений. Многие природные БАВ растительного и животного происхождения обладают лечебными свойствами и являются аналогами синтетических лекарственных препаратов. Наибольшее применение в промышленности получили экстракционные (новогалаеновые) *лекарственные препараты* (кардиотонические гликозиды), гормональные препараты (инсулин), ферментативные (антибиотики) лекарственные препараты, продуцируемые микроорганизмами. В Государственной фармакопее России большинство ($\approx 45\%$) медикаментов получены в промышленных условиях из *лекарственных растений*. Выделение и очистка биологически активных веществ (БАВ) из природного растительного и животного сырья в настоящее время остается сложной, трудоемкой и энергоемкой стадией промышленного производства.

При экстрагировании растительного или животного сырья водой или водно-спиртовыми растворами извлекаются кроме действующих веществ балластные вещества, которые не стабильны при хранении, снижают качество БАВ и требуют энергетических затрат на их очистку.

Целью исследований является разработка методологии получения биологически активных веществ из растительного и животного сырья.

Материалы и методы исследования

Для достижения поставленной цели приведен теоретический обзор ключевых этапов разрабатываемой методологии получения БАВ: классификация природных БАВ, структура и их физико-химические свойства, теоретические аспекты биосинтеза, экстракции, физиологические особенности. В качестве объекта исследования было взято растительное сырье, трава Адонис весенний (*Adonis vernalis*), для получения кардиотонического гликозида Адонизид и животное сырье, щитовидные железы домашних животных (свиней и крупного рогатого скота), для получения гормона инсулина, являющегося аналогом инсулина человека. В качестве растворителей использовали воду, алифатические спирты (C_2-C_4) (этанол, пропанол, изопропанол), ацетон, хлороформ, высаливателей – водные растворы солей (KCl, NaCl, NH_4Cl), ионообменные смолы (Вофатит R или ЭДЭ 10,11), оксид алюминия. Извлечение гликозида и инсулина осуществляли стандартными методами экстракции.

Результаты исследования и их обсуждение

Теоретические основы экстракции связаны с закономерностями распределения веществ между двумя гетерогенными жидкостями, фазовых равновесий бинарных и тройных систем, эффектом гомогенизации (всаливание), преобладающим взаимодействием гомогенизатор – растворитель [4]. Эффективность экстракции определяется коэффициентом распределения гомогенизатора между сосуществующими (сопряженными) фазами по формуле:

$$K = \frac{C_1^A}{C_2^A} = \text{const},$$

где C_1^A – насыщенный раствор гомогенизатора (А) в растворителе¹ (фаза 1); C_2^A – насыщенный раствор гомогенизатора (А) в растворителе² (фаза 2); К – коэффициент распределения (экстракции). Однако, выбор растворителя (экстрагента) осуществляется чаще всего эмпирически. Основными факторами, влияющими на процесс экстракции БАВ, являются: дисперсность растительного и животного сырья, температура, объем, природа и состав растворителя, поверх-

ность раздела фаз, время экстракции, вязкость раствора, температура, коэффициент экстракции. В связи с тем, что большинство природных БАВ являются биополимерами, аналогами лекарственных веществ [4, 11], необходимо иметь сведения о происхождении природных БАВ, их химическом строении, наличии и характере распределения полярных функциональных групп (гидрофильно-гидрофобном балансе) в макромолекулах полимера, которые увеличивают (всаливание) или уменьшают (высаливание) растворимость полимеров в низкомолекулярных жидкостях [1, 9]. Вместе с тем необходимы также знания о факторах, регулирующих биосинтез (*in vivo*) в живых организмах (растениях, животных, микроорганизмах), механизме физиологического воздействия на живые организмы. В свою очередь, тонкий органический синтез природных БАВ открывает пути к выяснению механизма действия химического соединения (лекарственного вещества) в клетке.

Биологически активные вещества (БАВ) – химические вещества, необходимые для поддержания жизнедеятельности живых организмов, обладающие высокой физиологической активностью при небольших концентрациях по отношению к определенным группам живых организмов или их клеткам (злокачественным опухолям), избирательно задерживая (или ускоряя) их рост или полностью подавляя их развитие. За единицу биологической активности химического вещества принимают минимальное количество этого вещества, способное подавлять развитие или задерживать рост определенного числа клеток, тканей стандартного штамма (биотеста) в единице питательной среды. Природные БАВ образуются в процессе жизнедеятельности живых организмов. Они могут образовываться в процессе обмена веществ, выделяясь в окружающую среду (экзогенные) или накапливаться внутри организма (эндогенные). Эффективность БАВ зависит от физиологических особенностей живых организмов, в растениях регулируется экологическими факторами (климат, погода, тип почвы и других) [9].

Многие БАВ впервые были получены из природного растительного и животного сырья и использовались для лечения болезней растений, животных, человека, борьбы с вредителями культурных растений (пестициды). Многие природные БАВ обладают токсикологическим действием, вызывая заболевания растений, животных, человека.

К ним относятся микотоксины, продуцируемые грибами (*Fusarium* или *Aspergillus*), вызывают заболевания высших растений (злаковых), устойчивы при хранении, термической обработке растительного сырья. В организме человека микотоксины ингибируют биосинтез белка, поражают сердечно-сосудистую систему, клетки костного мозга, лимфатических узлов, обладают канцерогенными свойствами.

Кардиотонические гликозиды увеличивают силу и уменьшают частоту сердечных сокращений, улучшают тканевой обмен сердечной мышцы, являются стероидами – производными циклопентанпергидрофенантрена, имеющими C_{17} – ненасыщенное лактонное кольцо: пятичленное бутенолидное (карденолиды) или шестичленное (кумалиновое) кольцо (буфаденолиды), содержатся в клеточном соке различных органов растений: семенах (строфанты), листьях (наперстянка, ландыш), цветках (ландыш), подземных органах (кендырь коноплевый). Экстракты природных душистых веществ, представляющие сложные смеси эфирных масел, используют для получения косметических, парфюмерных композиций, ароматерапии. Природные экзогенные БАВ, продуцируемые живыми организмами, способны ингибировать физиологические процессы других организмов (аллелопатия). Колины – органические соединения, выделяемые высшими растениями I через корневую систему, вызывающие угнетение высших растений II. Фитонциды – летучие органические соединения, выделяемые высшими растениями в атмосферный воздух, вызывают гибель патогенных микроорганизмов. Антибиотики – продукты жизнедеятельности микроорганизмов, угнетающие микроорганизмы II [2, 4]. Маразмизмы вызывают угнетение высших растений.

Эндогенные БАВ (белки, жиры, углеводы, витамины, ферменты, гормоны) представляют собой природные полимеры. Высокой интенсивностью биосинтеза белков отличаются многие микроорганизмы. Белки играют ключевую роль в образовании клеток, тканей организма, составляют основу биомембран. Поддерживают жизненно важные функции живых организмов.

Биологическая активность белков тесно связана с аминокислотным составом (протеины, протеиды). Растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все входящие в их состав аминокислоты из простых веществ – углекислоты, воды и минеральных солей. В организмах живот-

ных и человека некоторые аминокислоты (незаменимые) не могут синтезироваться и должны поступать в готовом виде как компоненты пищи. Длительное отсутствие в организме хотя бы одной незаменимой аминокислоты приводит к тяжелым заболеваниям человека и животных. Дефицит аминокислот компенсируют добавлением лекарственных препаратов. Гормоны «сигнальные химические вещества, вырабатываемые клетками тела и влияющие на клетки других частей тела» живого организма.

Свойства гормонов зависят от химического строения. Фитогормоны (ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота, этилен, брассиностероиды) взаимосвязаны в фитогормональной системе. Изменение уровня одного гормона приводит к изменению всей системы (биосинтез, деструкция и транспорт). Гормональные эффекты реализуются путем изменения конформации (пространственной структуры) макромолекул белков за счет образования активного комплекса (гормоно-рецепторного), выполняя роль преобразователя сигнала, между рецептором и определенной ферментативной системой [9, 11].

Предшественником большинства фитогормонов являются органические кислоты (аминокислоты). Биологические особенности транспортировки фитогормонов заключаются в том, что, образовавшись в одном органе (например, в апикальной меристеме стебля), они регулируют рост клеток в другом органе (корне). Ауксины, образуясь из аминокислоты триптофана, регулируют растяжение, деление и дифференцирование различных органов растений (тропизм), формирование проводящих флоэмных и ксилемных элементов в каллусной ткани. Цитокинины (зеатин) регулируют формирование хлоропластов на ранних стадиях развития листа, задерживают старение листьев, транспирацию листьев, повышая устойчивость клеток растения к различным неблагоприятным экологическим факторам (температуре, недостатку воды, повышенной засоленности, воздействию фитонцидов, рентгеновскому излучению). Гиббереллины, продуцируемые патогенным грибом *Gibberella fujicuro*, в растениях стимулируют растяжение клеток за счет повышения митотической активности меристемы, усиливают синтез клеточной стенки, переход к формированию генеративных органов к цветению, представляют собой терпеноиды, производные гибберелловой кислоты (ГК₃). Предшественником биосинтеза

(*in vivo*) гиббереловой кислоты является мевалоновая кислота. Дефицит гиббереллинов может привести к карликовости растений.

Этилен – экзогенный газообразный фитогормон, стимулирует опадание листьев, цветков, завязей и плодов, вызывает изменение ориентации микрофибрилл целлюлозы, выделяется при хранении яблок. Предшественником этилена в биосинтезе является аминокислота метионин. Биосинтез этилена усиливается при стрессе растений (травмах). Под действием этилена подавляется митотическая активность, блокируется транспорт ауксина, стимулируется биосинтез абсцизовой кислоты, ингибитора ауксина, цитокининов, гиббереллинов. Брассиностероиды относятся к малоизученным фитогормонам.

Методы экстракции являются и в настоящее время приоритетными в промышленности при производстве лекарственных препаратов из растительного и животного сырья. Экстракция БАВ представляет собой сложный последовательный процесс растворения, сорбции, десорбции, диализа, диффузии. Скорость экстракции определяется лимитирующей стадией (диффузией). Интерес к экстракционным новогаленовым препаратам обусловлен комплексным лечебным действием. Особое внимание уделяется в медицине кардиотоническим лекарственным препаратам для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, которые представляют смертельную угрозу для человека после онкологических заболеваний. Экстракцию кардиотонического гликозида (Адонизид) из растения осуществляют этанолом. Очистку от балластных веществ (хлорофиллов и смол) проводят высаливанием хлороформом с последующей адсорбцией на оксиде алюминия (толщиной 1...1,5 см). Использование инновационных методов экстракции (ультразвук низкой частоты, сжиженных газов) позволит снизить время лимитирующей стадии экстракции БАВ из растительного сырья в 10...1000 раз [5], что позволит минимизировать содержание балластных веществ, энергетические затраты при извлечении действующего вещества, гарантировать качество лекарственного препарата. Физический механизм действия ультразвука сводится к интенсивному перемешиванию внутри клетки, снижению гидростатического сопротивления движения, ускоряет теплообмен и массоперенос молекул растворителя и растворенных веществ через макропоры (0,1–0,2 мкм) клеточной мембраны в межклеточное про-

странство, диспергирование при экстракции. Новогаленовый препарат Адонизид, полученный с помощью ультразвуковой экстракции, отвечает всем требованиям Государственной фармакопеи [12].

Среди эндогенных БАВ в промышленности нашли применение в качестве лекарственных препаратов гормоны белково-пептидной группы (поджелудочной и паращитовидной железы), отвечающие за обменные процессы в организме человека, проникновение через мембрану клетки в ее ядро. Наибольший интерес для медицины представляет гормон инсулин (*insula*), который используют для лечения заболевания сахарного диабета за счет снижения концентрации глюкозы в крови, стимулирования образования в печени и мышцах из глюкозы гликогена, усиления синтеза липидов и белков. Стероидная группа гормонов синтезируется преимущественно в половых железах, а также надпочечниках (эстроген, прогестерон) и контролирует физическое развитие человека и процесс размножения, связываются с рецепторами на поверхности структурного элемента, запуская биосинтез молекул-посредников. Гидрофильные гормоны переносятся с током крови, а липофильные связываются с белками крови и транспортируются вместе с ней. Молекула инсулина образована двумя полипептидными цепями (А и В), которые соединяются двумя сульфидными (–S–S–) мостиками через остатки цистеина. А-цепь состоит из 21 аминокислотного остатка, В-цепь образована 30 аминокислотными остатками.

Биосинтез инсулина протекает на рибосомах шероховатой эндоплазматической сети с образованием неактивной формы предшественника гормона пептида препроинсулина, представляющего собой полипептидную цепь (110 аминокислотных остатков), построенную из последовательно расположенных пептидов: L-пептид, В-пептид, С-пептид и А-пептид. Затем от молекулы предшественника отщепляется сигнальный (L) пептид и образуется проинсулин, который транспортируется в комплекс Гольджи, где происходит созревание инсулина (лимитирующая стадия). При созревании молекула проинсулина разделяется на инсулин и биологически инертный пептидный остаток.

Промышленный способ получения инсулина в качестве лекарственного препарата основан на экстракции поджелудочной железы этанолом в кислой среде, фильтрации,

высаливании, многократной кристаллизации для очистки от примесей других гормонов, содержащихся в поджелудочной железе. Наибольшие энергетические затраты приходятся на стадии очистки инсулина [3, 6].

Проведенные авторами [7] исследования позволили обосновать способ получения инсулина экстракцией поджелудочной железы домашних животных (свиней, коров) алифатическими спиртами (C_3-C_4) пропанол, изопропанол в присутствии кислот ($pH = 1,5...3,5$), высаливание водными растворами солей KCl , $NaCl$, NH_4Cl ($5...25\%$), с последующим осаждением ацетоном для удаления липидов. Очистку инсулина проводили на ионообменных смолах (Вофатит R или ЭДЭ 10,11), используя в качестве элюента, водные растворы оснований ($LiOH$, NH_4OH , $NaOH$) ($pH = 7,5...9,5$).

Заключение

Предложена методология получения биологически активных веществ из растительного и животного сырья, основанная на принципах исследования химического строения предшественника БАВ, физико-химических свойств растворов, теоретических основ экстракции (распределения веществ между двумя несмешивающимися растворителями) [12], механизма биосинтеза и действия на живой организм, отсутствию в них токсичных примесей. Используя эту методологию, можно обосновать гипотезу механизма выделения инсулина указанным способом, который основан на денатурации в кислой среде белково-пептидной структуры гормона, деструкции белково-пептидной связи и повышении растворимости белка и липидов в полярном растворителе (спиртах). При введении в экстракт водных растворов солей происходит расслоение системы (высаливание), в результате которого липидная фракция переходит в спиртовой слой, а белковая фракция инсулина – в во-

дный слой. Оптимальный состав растворителя и высаливателя необходимо осуществлять с помощью изучения фазовых равновесий и изменения физико-химических свойств от состава. Предполагаемый механизм действия БАВ, обладающего лечебными свойствами, в живом организме – сложная последовательная реакция: транспорт к месту расположения мишени; распознавание мишени, биохимическое взаимодействие с ней по принципу сродства (аффинности); активизация мишени в результате образования активированного комплекса (Мишень БАВ).

Список литературы

1. Громова Н.Ю. Разработка методов стабилизации свойств водоразбавляемых олигомерных лакокрасочных материалов: дис. ... канд. техн. наук. – Тверь. 1991. – С. 47–71.
2. Громова Н.Ю., Косивцов Ю.Ю., Сульман Э.М. Технология синтеза и биосинтеза биологически активных веществ. – Тверь: ТГТУ, 2006. 82 с.
3. Громова Н.Ю., Кронов Д.М. Стандартизация новогаленовых препаратов как способ регулирования энергетических затрат производства // Вестник студенческого научного общества. – СПб., 2015. – Ч. 1. – С. 380–381.
4. Евстигнеева Р.П. Тонкий органический синтез. – М.: Химия, 1991. – 184 с.
5. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Высшая школа, 1986. – 448 с.
6. Пассет Б.А. Технология химико-фармацевтических препаратов и антибиотиков / Б.А. Пассет, В.Я. Воробьева. – М.: Медицина, 1977. – 430 с.
7. Покрышкин В.И., Тихонова Ю.В. Препараты моноинсулина в лечении сахарного диабета // Новые лекарственные препараты. – 1984. – № 9. – С. 8–15.
8. Способ получения инсулина / Т.Ю. Салова, Е.И. Милародова, Л.Л. Осипова, В.А. Зубцов // Бюллетень изобретений и полезных моделей, М 29, Пат. РФ № 4906513/14. 1993.
9. Способ получения пленкообразующего вещества / В.Ю. Григорьев, Н.Ю. Громова // Пат. РФ № 1754755. 1992.
10. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы / Дж. Теппермен, Х. Теппермен. – М.: Мир, 1989. – 656 с.
11. Тюкавкина Н.А., Бауков Ю.И. Биоорганическая химия. – М.: ДРОФА, 2005. – 542 с.
12. Хмелев В.Н., Леонов Г.В., Барсуков Р.В. Ультразвуковые многофункциональные и специализированные аппараты для интенсификации технологических процессов в промышленности, сельском и домашнем хозяйстве. – Барнаул, 2007. – 399 с.