

(19) **KG** (11) **730** (13) **C1** (46) **31.12.2004**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И **A61K 35/78**
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(21) 20030077.1

(22) 21.07.2003

(46) 31.12.2004, Бюл. №12

(76) Зурдинов А.З. (KG)

(56) Патент RU №2038089, кл. A61K 35/78, 1995

(54) **Способ получения фитопрепарата "Иммуназ"**

(57) Изобретение относится к фармации и фармакологии, а именно к получению лекарственного препарата растительного происхождения, обладающего фармакотерапевтической (иммуномодулирующей) активностью. Задачей изобретения является обоснование периода сбора сырья - листьев растения черемуха Грея (*Radus Grajana Maxim*), исходя из максимального накопления биологически активных веществ, зависящего от вегетационного периода, и выбор необходимой концентрации экстрагента для получения фитопрепарата с максимальным содержанием биологически активных веществ. Задача решается получением фитопрепарата «Иммуназ» с оптимальным содержанием биологически активных веществ из листьев черемухи Грея (*Radus Grajana Maxim*). Сбор развитых низких и средних стеблевых листьев растения *Radus Grajana Maxim* осуществляют в июле-августе, затем высушенное сырье экстрагируют, для чего намачивают сырье половинным количеством экстрагента в течение 4-5 часов и далее загружают сырье в перколятор, заливают остальным количеством экстрагента и выдерживают в течение 6 суток с последующим отстаиванием в течение нескольких суток и фильтрованием, причем в качестве экстрагента используют 40 %-ный этанол при соотношении сырье: экстрагент 1:10. 1 пр., 3 табл.

Изобретение относится к фармации и фармакологии, а именно к получению лекарственного препарата растительного происхождения, обладающего фармакотерапевтической (иммуномодулирующей) активностью.

Важнейшим критерием, определяющим качество лекарственного сырья, является содержание в нем фармакологически активных веществ. Поэтому продуктивность лекарственных растений нельзя оценивать только по товарной массе. Важно, чтобы одновременно в ней находилось и максимальное количество необходимых действующих веществ.

Известен способ получения препарата, представляющего собой водный экстракт из наземных частей растения черемуха Грея (*Radus Grajana Maxim*), которое растет на юге Японии. На территории СНГ черемуха Грея культивирована в Чуйской долине Кыргызской Республики. Водный экстракт из наземных частей растения *Radus Grajana Maxim* готовится фармакопейным способом в соотношении сырья к извлекателю 1:30. Лекарственное сырье измельчается до частиц размером 3-5 мм, навеска сырья помещается

в колбу, заливается расчетным количеством кипящей воды и нагревается при температуре 100°C в течение 5 минут, после чего настаивается в течение 45 минут. Затем вытяжку процеживают в подставку, отжимая сырье [Патент RU 2038089, кл. A61K 35/78, 1995].

Недостатком известного способа является то, что не учитывается состав используемого сырья, содержание биологически активных веществ в используемом сырье и получаемом препарате, а также небольшой срок хранения препарата.

Задачей изобретения является обоснование периода сбора растительного сырья - листьев черемухи Грея (*Padus Grajana Maxim*), исходя из максимального накопления биологически активных веществ, зависящего от вегетационного периода, и выбор необходимой концентрации экстрагента для получения более стабильного фитопрепарата с максимальным содержанием биологически активных веществ.

Задача решается получением нового оригинального фитопрепарата «Иммуназ» с оптимальным содержанием биологически активных веществ из листьев черемухи Грея (*Padus Grajana Maxim*).

Для установления оптимальных сроков сбора лекарственного сырья проведено изучение динамики накопления биологически активных веществ в листьях изучаемого растения в зависимости от периода вегетации.

Сбор лекарственного сырья осуществлялся ежемесячно в период с апреля по сентябрь. Листья собирались вручную с помощью садовых ножниц вместе с черешком, с оставлением на растении части листьев, чтобы не нарушить его развития. Собирались только развитые низкие и средние стеблевые листья.

Собранные листья сушили методом воздушно-теневого сушки под хорошо проветриваемым навесом, периодически перемешивались, после сушки листья измельчались до размера частиц 1 -3 мм и сырьё приводилось в стандартное состояние, т. е. в состояние, когда оно по качеству полностью соответствует требованиям стандартов.

В высушенном и измельченном сырье определялась динамика накопления аскорбиновой кислоты, амигдалина, флавоноидов, дубильных веществ, моно-, олиго- и полисахаридов в зависимости от периода вегетации изучаемого растения.

Проведенные биохимические исследования показали, что содержание биологически "активных веществ в листьях изучаемого растения имеет значительные отличия, зависящие от времени заготовки лекарственного сырья (табл. 1).

Таблица 1

Динамика накопления БАВ в листьях изучаемого растения в различные периоды вегетации

БАВ	Период вегетации					
	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь
Аскорбиновая кислота (%)	0.03	0.05	0.07	0.06	0.06	0.04
Амигдалин (мкг/л)	0.0795	0.0882	0.1355	0.1448	0.1295	0.0498
Дубильные вещества (%)	2.7	3.2	4.1	4.0	4.1	3.1
Флавоноиды (%)	0.22	0.23	0.25	0.28	0.29	0.2
Полисахариды (%)	2.7	3.7	8.5	8.9	9.5	5.5
Моносахариды (%)	5.0	6.1	7.4	7.1	9.3	6.3
Олигосахариды (%)	6.1	7.2	7.1	8.2	9.7	6.4

Из таблицы 1 видно, что максимальное накопление в лекарственном сырье аскорбиновой кислоты и амигдалина приходится на июнь, июль и август. При этом содержание указанных веществ в сырье превышает их содержание в апреле в 1.5-2 раза.

Содержание аскорбиновой кислоты в сырье в сентябре продолжает оставаться более высоким, чем в апреле и составляет 0.04 %.

Анализ динамики накопления в лекарственном сырье амигдалина показывает, что содержание этого гликозида достигает максимума в июле, а в августе снижается на 10 %. В сентябре происходит еще более резкое снижение содержания амигдалина в листьях (до 0.0498 мкг/л), что на 61 % меньше, чем в августе. При этом содержание амигдалина в сырье в сентябре в 1.5 раза меньше, чем в апреле.

Установлено, что содержание флавоноидов в лекарственном сырье постепенно возрастает с апреля, достигая максимума в августе. В сентябре регистрируется снижение содержания флавоноидов до значений апреля.

Результаты проведенных исследований показали, что динамика накопления в изучаемом лекарственном сырье дубильных веществ, поли-, олиго- и моносахаридов имеет одинаковую направленность.

Количественное содержание указанных биологически активных веществ в листьях изучаемого растения начинает увеличиваться с мая, достигая своего максимума в августе. В сентябре содержание этих биологически активных веществ уменьшается, при этом содержание дубильных веществ и олигосахаридов практически достигает значений в апреле. Снижение содержания в сырье поли- и моносахаридов в сентябре происходит в меньшей степени, чем дубильных веществ и олигосахаридов. Так, содержание полисахаридов в листьях изучаемого растения в сентябре превышает их значения в апреле в 2 раза, а содержание моносахаридов - в 1.26 раза.

Таким образом, исследования по изучению накопления физиологически активных веществ в зависимости от периода вегетации показали, что их наибольшее содержание в листьях изучаемого растения отмечается в июле и августе, следовательно, указанные месяцы являются оптимальными для заготовки лекарственного сырья.

Технология получения фитопрепарата «Иммуназ». Получение фитопрепарата «Иммуназ» осуществляется методом экстракции и состоит из следующих стадий: подготовка лекарственного растительного сырья и экстрагента, экстрагирование лекарственных веществ из растительного материала, очистка экстракта, стандартизация готового продукта. *Выбор экстрагента.* Многие виды лекарственного растительного сырья обладают дифильными свойствами, но имеют большее сродство к гидрофильным экстрагентам. В результате фитохимических исследований сырья *Padus Grajana Maxim* было установлено, что содержащиеся в нем биологически активные вещества преимущественно относятся к группе гидрофильных соединений, на основании чего в качестве экстрагента использовался этанол в разных концентрациях. Для определения оптимальной концентрации этанола, которая обеспечивает максимальный выход биологически активных веществ из листьев *Padus Grajana Maxim*, были проведены исследования, результаты которых приведены в таблице 2.

Выход БАВ из лекарственного сырья в зависимости от концентрации применяемого экстрагента (этанол)

БАВ	Концентрация экстрагента (этанол), %		
	70	60	40
Аскорбиновая кислота (%)	0.03	0.04	0.07
Амигдалин (по цианид-иону, мкг/л)	0.0795	0.0805	0.0995
Дубильные вещества (%)	9.0	6.5	4.1
Полисахариды (%)	2.2	4.1	9.5
Флавоноиды (%)	0.19	0.25	0.27

Проведенные эксперименты показали, что чем выше концентрация этанола (60, 70 %), тем больше был выход дубильных веществ, которые, как известно, в некоторых случаях могут препятствовать всасыванию других действующих веществ из желудочно-кишечного тракта, соответственно снижая биодоступность препарата.

В то же время при уменьшении концентрации этанола наблюдалось в разной степени выраженное увеличение выхода биологически активных веществ из изучаемого сырья. Так, уменьшение концентрации этанола с 70 до 60 % увеличило выход полисахаридов практически в 2 раза. При использовании 40 % этанола выход полисахаридов увеличился в 2.3 раза по сравнению с использованием 60 % этанола и в 4.3 раза по сравнению с использованием 70 % экстрагента.

Использование 60 % экстрагента увеличивает выход флавоноидов из сырья на 31.6 % по сравнению с применением 70 % этанола. При использовании 40 % этанола выход из сырья флавоноидов увеличивался на 42 %.

Применение 60 % экстрагента увеличивает выход аскорбиновой кислоты из сырья на 33.3 % по сравнению с применением 70 % этанола. При использовании 40 % этанола выход аскорбиновой кислоты из сырья резко возрастал и достигал 0.07 %. т.е. увеличился в 2.5 раза по сравнению с использованием 70 % этанола.

При использовании 70 и 60 % этанола выход амигдалина (по цианид-иону) из сырья был практически одинаков, уменьшение концентрации этанола до 40 % приводило к увеличению выхода амигдалина на 20 %.

Таким образом, из полученных данных следует, что использование в качестве экстрагента 40 % этанола позволяет получить максимальный выход из сырья биологически активных веществ при минимальном выходе дубильных веществ. Следовательно, указанная концентрация этанола и является оптимальной для получения фитопрепарата «Иммуназ».

Способ получения фитопрепарата «Иммуназ» реализуется следующим образом. В качестве лекарственного растительного сырья используют листья растения *Radus Grajana Maxim.* Сбор листьев осуществляют в июле-августе, собирают только развитые низкие и стеблевые листья. Высушенное сырье экстрагируют, намачивая его половинным количеством экстрагента в течение 4-5 часов, а затем сырье загружают в перколятор, заливают остальным количеством экстрагента и выдерживают в течение 6 суток. В качестве экстрагента используют 40 % этанол. Соотношение сырья к экстрагенту 1:10. Очистку препарата проводят путем отстаивания в течение нескольких суток при температуре не выше 8°C и последующим фильтрованием.

Пример. Для приготовления 1 л фитопрепарата в соотношении сырья к экстрагенту 1:10 используют нужную навеску сухого сырья, измельченного до размера частиц в 2 мм, и этанол, количество которого рассчитывается с учетом коэффициента поглощения ($K = 3$). Затем проводится намачивание сырья половинным количеством экстрагента по отношению к массе сырья в течение 4-5 ч без перемешивания. Набухший материал

загружается в экстрактор достаточно плотно, чтобы в сырье оставалось как можно меньше воздуха. Сверху растительный материал покрывается куском полотна, прижимается перфорированным диском и заливается 40 % этанолом. Экстракция проводится в течение 6 суток. Очистка фитопрепарата осуществляется путем отстаивания в течение 3 суток при температуре не выше 8°C и последующим фильтрованием.

Фитопрепарат «Иммуназ» представляет собой жидкость светло-коричневого цвета со своеобразным специфическим запахом.

Стандартизация полученного фитопрепарата проводится по качественному и количественному содержанию биологически активных веществ (амигдалин, дубильные вещества), концентрации этанола, сухому остатку, величине pH, содержанию тяжелых металлов. Кроме того, определяется его микробиологическая чистота.

Качественное и количественное определение амигдалина проводилось по веществам, которые образуются в процессе его кислотного гидролиза, в результате которого амигдалин расщепляется на глюкозу, бензальдегид и синильную кислоту.

Качественное определение амигдалина (по цианид-иону) проводилось по образованию гексацианоферрата (II) железа (III)-берлинской лазури слабо-голубого цвета.

Количественное определение амигдалина (по цианид-иону). Для анализа использовалось 50 мл фитопрепарата "Иммуназ". Кислотный гидролиз амигдалина проводился с отгонкой цианисто-водородной кислоты, после чего определялось ее количественное содержание фотоколориметрическим методом с пиридином и барбитуровой кислотой в качестве реагентов. Количественное содержание амигдалина (по цианид-иону) в изучаемом фитопрепарате должно быть в пределах 0.1295-0.1448 мкг/л.

Качественная реакция на дубильные вещества проводилась с использованием 3 % раствора железа окисного хлорида, в результате чего в проходящем свете наблюдалось буро-зеленое окрашивание.

Количественное определение дубильных веществ, проводилось с использованием перманганатометрического титрования с соответствующими реактивами. Количественное содержание дубильных веществ в фитопрепарате должно быть в диапазоне 2.7-4.1 %.

Концентрация этанола в препарате «Иммуназ» определялась методом газовой хроматографии. В качестве стандартного образца служил 40 % этанол точной концентрации (температура 20°C).

Определение содержания сухого остатка фитопрепарата «Иммуназ» проводилось согласно "Государственной фармакопеи СССР, XI издание, 1990 (ГФ XI). Установлено, что его норма для изучаемого фитопрепарата должна быть не менее 1.5 %.

Для определения количественного содержания тяжелых металлов фитопрепарата «Иммуназ» использовалась методика и требования ГФ XI. Результаты проведенных исследований показали, что количественное содержание тяжелых металлов в изучаемом препарате соответствует требованиям ГФ XI (не более 0.001 %).

Результаты определения pH полученного фитопрепарата показали, что он имеет значения от 5.0 до 6.5.

Еще одним важным показателем, определяющим доброкачественность фитопрепарата, является его микробиологическая чистота. Микробиологическая чистота фитопрепарата «Иммуназ» определялась в асептических условиях с применением методов и питательных сред, приведенных в общей статье "Методы микробиологического контроля лекарственных средств: Государственная фармакопея СССР, XI издание 1990, а также с дополнительными изменениями (1995, 2002, 2003).

Требования и результаты исследования микробиологической чистоты фитопрепарата «Иммуназ» приведены в таблице 3.

Микробиологическая чистота фитопрепарата «Иммуназ»

Рекомендуемые требования		Результат
Общее число аэробных бактерий	не более 10^5 в 1 мл	не более 10^4 в 1 мл
Общее число дрожжевых и плесневых грибов (суммарно)	не более 10^4 в 1 мл	не более 10^2 в 1 мл
Общее число энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий	не более 10^3 в 1 мл	не более 10^2 в 1 мл
<i>Escherichia coli</i>	наличие не допускается	отсутствуют
<i>Salmonella</i>	наличие не допускается	отсутствуют
<i>Staphylococcus aureus</i>	наличие не допускается	отсутствуют
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	наличие не допускается	отсутствуют

Таким образом, фитопрепарат "Иммуназ" получают методом экстракции из лекарственного растительного сырья, собранного в оптимальные сроки вегетации, когда накапливается максимальное количество биологически активных веществ.

Преимущество способа получения фитопрепарата заключается в научно обоснованном выборе концентрации экстрагента по выходу целевых веществ и в определении оптимальных сроков заготовки сырья по показателям накопления биологически активных веществ в растении в зависимости от периода вегетации.

Формула изобретения

Способ получения фитопрепарата, включающий сбор лекарственного растительного сырья - *Padus Grajana Maxim*, экстрагирование действующих веществ и стандартизацию препарата, отличающийся тем, что в качестве растительного сырья используют только развитые низкие и средние стеблевые листья растения *Padus Grajana Maxim*, сбор осуществляют в июле-августе, затем высушенное сырье экстрагируют, для чего намачивают сырье половинным количеством экстрагента в течение 4-5 часов и далее загружают сырье в перколятор, заливают остальным количеством экстрагента и выдерживают в течение 6 суток с последующим отстаиванием в течение нескольких суток и фильтрованием, причем в качестве экстрагента используют 40 %-ный этанол при соотношении сырья к экстрагенту 1:10.

Составитель описания
Ответственный за выпуск

Бакеева С.К.
Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03