

(19)



(10) **LT 4146 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **4146**

(51) Int. Cl.⁶: **A61K 35/78**

(21) Paraiškos numeris: **95-063**

(22) Paraiškos padavimo data: **1995 06 08**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1997 01 27**

(45) Patent paskelbimo data: **1997 04 25**

(72) Išradėjas:

Valdimaras Janulis, LT
Vladimir Glyzin, RU

(73) Patent savininkas:

Kauno medicinos akademija, A. Mickevičiaus g. 9, 3000 Kaunas, LT

(54) Pavadinimas:

Priešvirusinio preparato gamybos būdas

(57) Referatas:

Išradimas priskirtinas medicinai, tiksliau chemijos ir farmacijos pramonei. Išradimo tikslas - technologinio proceso supaprastinimas.

Išradimo esmė yra tame, kad ekstrahuojant augalinę žaliavą etilo spiritu, garinant ištraukas, valant, ekstrahuojant flavonoidus n-butilo spiritu, pakartotinai koncentruojant ir džiovinant, naudoja kanadietiškojo desmodiumo (*Desmodium canadense* D.C.) žolę, o valymą atlieka 0,3 % želatinos tirpalu ir ekstraktą separuoja. Pareiškiamas priešvirusinio preparato gamybos būdas supaprastina technologinį procesą, nes vietoj ekstrakto išvalymo dichloretanu naudoja ekstrakto valymą želatinos tirpalu, o laukinį augalą *Lespedeza hedysaroides* su ribota žaliavos baze pakeičia kultivuojamu augalu kanadietiškuoju desmodiumu. Gatavo produkto išeiga padidėja 2 kartus.

Išradimas priskirtinas medicinai, tiksliau chemijos ir farmacijos pramonei bei susijęs su priešvirusinio preparato gaminiu iš augalinės vaistinės žaliavos.

Žinomas priešvirusinio preparato "Helepinum" gamybos būdas (žr.buv. TSRS aut. liud. Nr. 648032 TPK A 61 k 35/78, 1977) iš Lespedeza hedysaroides (Pall.) Kitag, antžeminės dalies. Dar žinomas pramoninis "Helepinum" gamybos būdas (žr. Opytno-promyšlennyj reglament na proizvodstvo helepina. //PEZ VILR, No 39-10-077. -M., 1986.-P.86), pagal kurį 20,8 kg Lespedeza hedysaroides (Pall.) Kitag žolės susmulkina malūnu. Susmulkintą žaliavą patalpina į ekstrahavimo aparatą su maišikliu ir išoriniu šildytuvu, užpila 145 l trečios spiritinės ištraukos iš ankstesnės įkrovos ir 45 l 50% etilo alkoholio (žaliavos ir tirpiklio santykis 1:7 plius etilo alkoholio tūriui po pseudodugnu užpildyti) ir ekstrahuoja (55-60)°C temperatūroje, nuolat maišant 2 valandas. Ištrauką supila į surinktuvą, žaliavą užpila 50% etilo alkoholio kiekiu, lygiu nupiltam, ir vėl ekstrahuoja 1 valandą. Analogišką ekstrakciją atlieka dar kartą. Pirmos, antros ir trečios ekstrakcijų metu gaunama po 145 l ištraukų. Pirmą ir antrą ištraukas garina kartu iki 45 l likučio distiliacijos aparate. Trečią ištrauką panaudoja ekstrahuoti naują augalinę žaliavą. Vandeninę ekstraktą aparate atšaldo ir palieka nusistovėti 12 valandų. Atšaldytą ekstraktą separuoja ir po to valo 2 kartus po 4 l dichloretanu. Iš išvalyto ekstrakto flavonoidus ekstrahuoja n-butilo alkoholiu, prisotintu vandeniu, 6 kartus po 15 l. Gaunama 88 l n-butilo alkoholio ištraukų, kurias perplauna vandeniu, prisotintu n-butilo alkoholiu. Butanolio ištraukas garina vakuume iki 2,5 l. Gautą likutį laiko 12 valandų (10-12)°C temperatūroje. Preparato "Helepinum" nuosėdas nufiltruoja, praplauna chloroformu 4 kartus po 300 ml ir džiovina. Išdžiovintą "Helepiną" ištirpina 1 litre 50% etilo alkoholio ir džiovina (14-16) valandų (70-75)°C temperatūroje. Preparato išeiga - 40,85% flavonoidų kiekio nuo technologinio proceso pradžios.

Žinomo būdo trūkumai yra: 1) technologiniame procese naudojami nuodingi sprogimą sukeliantys organiniai tirpikliai chloroformas ir dichloretanas; 2) Respublikoje nėra laukinio augalo Lespedeza hedysaroides (Pall.) Kitag žaliavos bazės; 3) Maža preparato "Helepinum" išeiga.

Išradimo tikslas - technologinio proceso supaprastinimas.

Nurodytas tikslas pasiekiamas tuo, kad priešvirusinio preparato "Helepinum D" gamybos būdas, ekstrahuojant žaliavą etilo alkoholiu, garinant ištraukas, valant, ekstrahuojant flavonoidus n-butilo alkoholiu, pakartotinai koncentruojant ir džiovinant, naudoja kanadietiškojo desmodiumo žolę (Desmodium canadense D.C.), o valymą atlieka 0,3% želatinos tirpalu ir ekstraktą separuoja.

Priešvirusinio preparato "Helepinum D" gamybos būdo pavyzdys.

15,6 kg kanadietiškojo desmodiumo žolės susmulkina augalinei žaliavai smulkinti skirtu malūnu iki 5 mm didumo dalelių. Susmulkintą žaliavą patalpina į ekstraktorių su maišikliu ir išoriniu šildytuvu. Ją užpila 155 l trečios ištraukos iš ankstesnės įkrovos ir 45 l 90% etilo alkoholio (santykiu žaliava:ekstrahentas /1:10/ ir 50 l etilo alkoholio pseudodugnei po ekstraktoriumi užpildyti) ir ekstrahuoja (60-70)°C temperatūroje, nuolat maišant 2 valandas. Ištrauką supila į surinktuvą ir ant augalinės žaliavos užpila 90% etilo alkoholio kiekį, lygų nupiltam, ir vėl ekstrahuoja analogiškais sąlygomis 1 valandą. Analogišką ekstrakciją atlieka dar kartą. Pirmos ekstrakcijos metu gauna 156 l ištraukos, antros - 155 l ir trečiosios - 154 l. Pirmą ir antrą ištraukas apjungia ir koncentruoja kartu iki 6 l likučio. Trečią ištrauką naudoja naujos augalinės žaliavos ekstrakcijai. 6 l koncentruoto ekstrakto maišo su 0,3% želatinos tirpalu, po to separuoja. Flavonoidus iš išvalyto ekstrakto ekstrahuoja n-butilo alkoholiu, prisotintu vandeniu, užpilant 3 kartus po 20 l. Gauna 6 l n-butanolio ištraukos, kurią praplauna vandeniu, prisotintu n-butilo alkoholiu 2 kartus po 10 l. Gauna 6 l n-butanolio ištraukos, kurią garina iki visiško butilo alkoholio pašalinimo. Vandeninį flavonoidų tirpalą sumaišo su 96% etilo alkoholiu ir džiovina vakuuminėje džiovinimo spintoje 5 valandas. Gauna 0,272 kg galutinio produkto "Helepinum D", o tai sudaro 82,07% flavonoidų kiekio nuo technologinio proceso pradžios.

Preparato "Helepinum D" kiekybinio nustatymo metodika. Apie 0,1 g preparato "Helepinum D" (tikslī masė) suberiama į 250 ml tūrio matavimo kolbą ir ištirpiname 200 ml parūgštinto 95% etanolio. Po to kolbos turinys praskiedžiamas parūgštintu 95% etanolio iki brūkšnio (tirpalas A). 1 ml gauto tirpalo (tikslus tūris) įpilamas į 25 ml talpos matavimo kolbą ir praskiedžiamas parūgštintu 95% etanolio iki brūkšnio ir gerai sumaišoma (tirpalas B). Spektrofotometru matuojamas tirpalo B optinis tankis prie 352 nm bangos ilgio 1 cm storio kiuvetėje.

Palyginimui naudojamas parūgštintas 95% etanolis. Lygiagrečiai matuojamas Valstybinio standartinio liuteolino tirpalo optinis tankis.

Procentinis flavonoidų kiekis preparate "Helepinum D" (%), perskaičiuotas absoliučiai sausai medžiagai apskaičiuojamas pagal formulę:

$$X = \frac{1,86 \cdot 6250 \cdot 100 \cdot a_0 \cdot D_1}{100 \cdot 100 \cdot a_1 \cdot D_c} \cdot \frac{100}{100 - b};$$

kur D_1 -tiriamąjo tirpalo optinis tankis

D_c -Valstybinio standartinio liuteolino tirpalo optinis tankis

a_1 - atsverto preparato masė g

a₀- atsverto Valstybinio standartinio liuteolino masė g

b- preparato masės netektis džiovinant, procentais

1,86 - perskaičiavimo koeficientas į Liuteoliną

Flavonoidų mišinio kiekis preparate "Helepinum D" turi būti ne mažesnis kaip 55%, perskaičiavus į Liuteoliną ir absoliučiai sausą medžiagą.

Pastaba 1. Valstybinio standartinio liuteolino tirpalo paruošimas. Apie 0,05 g (tiksliai masė) Valstybinio standartinio liuteolino (LFS 42-1709-87) išdžiovinto iki pastovios masės laike 2 val prie temperatūros nuo 100 iki 105°C, patalpinama į 100 ml talpos matavimo kolbą. Įpilama 50 ml parūgštinto 95% etanolio ir išmaišoma. Po to praskiedžiama parūgštintu 95% etanolio iki brūkšnio (tirpalas A). 1 ml tirpalo A įpilama į 100 ml matavimo kolbą, praskiedžiama 95% etanolio iki brūkšnio ir sumaišoma (tirpalas B).

Pastaba 2. Parūgštinto 95% etanolio paruošimas. 100 ml etanolio sumaišoma su 20 ml 1% vandenilio chlorido rūgšties.

Tapatybės nustatymas. 1). UV-spektras preparato "Helepinum D" tirpalo, paruošto kiekybiniam nustatymui prie bangos ilgio nuo 230 iki 400 nm turi šviesos sugėrimo maksimumus prie (270±3) nm ir (345±3) nm; minimumus (249±3) nm ir (303±3) nm, ekstremumą arba petį prie (261±4) nm.

2). 0,02 g preparato "Helepinum D" tirpina 5 ml 95% etanolyje, įpila 0,15 ml koncentruotos vandenilio chlorido rūgšties ir įberia 0,05 g magnio miltelių. Tirpalas nusidažo raudonai, kas patvirtina flavonoidų buvimą.

Pareiškiamo būdo privalumai (lyginant su prototipu) : 1) Vietoj ekstrakto išvalymo dichloretanu, naudoja ekstrakto valymą želatinos tirpalu. 2) Laukinį augalą *Lespedeza hedysaroides* su ribota žaliavos baze pakeičia kultivuojamu augalu kanadietiškuoju desmodiumu. 3) Du kartus padidėja gatavo produkto išeiga.

Atlikus preparato citostatinio aktyvumo tyrimus, panaudojant vištų embrionų fibroblastų kultūrą, nustatyta, kad preparatas "Helepinum D", pagamintas iš kanadinio desmodiumo žolės, kurio koncentracija 62,5 µg/ml nedavė citostatinių pakitimų.

Tiriant preparato "Helepinum D" priešvirusinį veikimą, nustatyta, kad prie daugkartinio užkrėtimo 1, 10 ir 100 TCD₁₀₀/ml preparatas "Helepinum D", kurio koncentracija 10 µg/ml pilnai inhibavo viruso 1 TCD₁₀₀ VPG-1, štamą L₂ vištų embrionų fibroblastų kultūroje.

Preparato, gauto pareiškiamuoju būdu, toksiškumo tyrimai buvo atlikti su 60-čia 3-jų savaičių amžiaus žiurkiukų (patinai, patelės, kūno svoris 34-40 g) ir 50 lytiškai subrendusių žiurkių (patinai, patelės, kūno svoris 150-180 g). Preparatas vieną kartą sugirdomas arba injekuojamas į pilvaplėvės ertmę.

Atliekant tyrimus žiurkiukams, jiems buvo sugirdoma 0,5-2,0 ml 5-50% vandeninio preparato tirpalo, žiurkėms buvo sugirdoma 10-80 % vandeninio preparato tirpalo, paruošto prieš naudojimą. Stebėjimai buvo vykdomi 10-15 dienų.

Suleidus į pilvaplėvės ertmę žiurkiukams vandeninio preparato tirpalo nuo 100 iki 800 $\mu\text{kg/kg}$ ir žiurkėms - nuo 200 iki 800 $\mu\text{kg/kg}$ intoksikacijos požymių pastebėta nebuvo. Padidinus preparato dozę iki 1000-2000 $\mu\text{kg/kg}$ gyvūnai buvo truputį judresni, atsirado dusulys, ausų kaušelio ir uodegos smulkių kraujagyslių hiperemija. Po 20-30 min. sujaudinimo simptomai susilpnėdavo, gyvūnų aktyvumą keitė jų slopinimas. Pavieniai gyvūnai žuvo 2-3 parą.

Sugirdant preparato dozėmis nuo 10 000 iki 30 000 $\mu\text{kg/kg}$ žiurkiukams ir 10 000 - 50 000 $\mu\text{kg/kg}$ žiurkėms, intoksikacijos požymių nepastebėta. Dėl techninių priežasčių daugiau preparato dozių didinti buvo neimanoma. (Lentelė).

Tokiu būdu, tyrimų rezultatai, gauti atlikus preparato toksiškumo tyrimus, vieną kartą sugirdant arba injekuojant į pilvaplėvės ertmę preparatą parodo, kad preparatas santykinai nenuodinga medžiaga, statistškai patikimų nukrypimų preparato jautrumo tarp lytiškai subrendusių žiurkių ir 3-jų savaičių žiurkiukų nepastebėta.

Lentelė

Preparato "Helepinum D" gauto iš kanadinio desmodiumo toksiškumo rodikliai, įvedant vieną kartą preparatą į skrandį ir išvirkščiant į pilvaplėvės ertmę

Laboratorinių gyvūnų rūšis ir lytis	Toksiškumo rodikliai			
	LD ₁₀	LD ₁₆	LD ₅₀ $\pm m$	LD 84
Įšvirkščiant į pilvą				
Žiurkiukai (patinai ir patelės)	2200	2420	3300-420	3900
Baltos berušės žiurkės (patinai)	2480	2630	3500 -510	4960
Baltos berušės žiurkės (patelės)	1830	2100	3150 480	4200
Įvedant į skrandį				
Žiurkiukai (patinai ir patelės)	daugiau 30 000			
Baltos berušės žiurkės (patinai)	daugiau 50 000			
Baltos berušės žiurkės (patelės)	daugiau 50 000			

Su preparato "Helepinum D" gauto iš kanadinio desmodiumo žolės vaistų formomis: Helepinum D 1% ir 5% tepalu ir Helepinum D tabletėmis po 0,25 g atlikti klinikiniai tyrimai su 408 ligoniais, tame skaičiuje su 165 vaikais nuo 2 iki 14 metų amžiaus.

Išradimo apibrėžtis

Priešvirusinio preparato "Helepinum D" gamybos būdas, ekstrahuojant augalinę žaliavą etilo alkoholiu, garinant ištrauką, valant, ekstrahuojant flavonoidus n-butilo alkoholiu, pakartotinai koncentruojant ir džiovinant, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad preparato gamybai naudoja kanadietiškojo desmodiumo žolę (Desmodium canadense D.C.), o valymą atlieka 0,3% želatinos tirpalu ir ekstraktą separuoja.