



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 7449
(51) A61K 36/00 (2006.01)
B01D 11/00 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2022/0218.2

(22) 16.03.2022

(45) 16.09.2022, бюл. №37

(72) Джакиянов Амангельды Муратович; Сакипова Зуриядда Бектемировна; Жумашова Гульсिम Токановна; Кәрім Олжас Абайұлы

(73) Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова»

(56) RU 2425094 C2, 27.07.2021

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСТРАКТА ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

(57) Полезная модель относится к области фармации и косметологии, в том числе лечебной, в частности к технологии получения экстрактов растения аяния.

Техническим результатом полезной модели является расширение ассортимента растительных экстрактов из местного растительного сырья, повышение антибактериальной активности и сохранение БАВ.

Способ включает измельчение растительного сырья, смачивание измельченного растительного сырья раствором этанола, экстракцию раствором

этанола и очистку вытяжки от шрота. Отличиями предлагаемого способа являются то, что в качестве растительного сырья используют листья и/или стебли и/или цветки аянии кустарничковая (*Ajania fruticulosa*) и/или аянии щитковая (*Ajania fastigiata*), измельчение осуществляют до размеров 5 мм., далее осуществляют смачивание 50-90% раствором этанола в соотношении сырье: раствор этанола 1: (1-10) при температуре не выше 30°C в течение 12-24 часов, экстракцию осуществляют в ультразвуковой установке 50-90% раствором этанола в соотношении сырье и экстрагент 1: (1-10) с частотой ультразвукового воздействия 20-40 кГц в течение 30-60 минут, после очистки вытяжки от шрота осуществляют удаление экстрагента до состояния густого или сухого экстракта.

Кроме того, качестве ультразвуковой установки используют ультразвуковую ванну, очистку вытяжки от шрота осуществляют центрифугированием и ее фильтрацией.

Помимо этого, удаление экстрагента проводят в роторном испарителе под вакуумом при температуре 30 - 50°C и давлении 3,5 кПа.

(19) KZ (13) U (11) 7449

Полезная модель относится к области фармации и косметологии, в том числе лечебной, в частности к технологии получения экстрактов из растения аяния.

Известен способ получения масляного экстракта из надземной части аянии кустарничковой (*Ajania fruticulosa* (Ledeb.) Poljak) (Ханина М.А., Серых Е.А., Атажанова Г.А., Адекенов С.М., Покровский Л.М., Ткачев А.В. Эфирное масло *Ajania fruticulosa* (Ledeb.) Poljak //Химия растительного сырья. -1999. -№ 3. -С. 49-56). Способ включает экстракцию надземной части (стеблей, листьев, соцветий) растения аянии кустарничковой способом гидродистилляции водяным паром на аппарате Клэвенджера в течение 2-8 часов, охлаждение паров в холодильнике и отделение масляного экстракта аянии от воды в делительной воронке. При этом получают масляный экстракт аянии с выходом продукта не более 0,70%. Масляный экстракт аянии содержит биологические активные вещества (далее – БАВ), такие, как флавоноиды, хамазулен, сесквитерпеновые лактоны и др.

Недостатками известного способа являются длительное время извлечения БАВ из-за использования гидродистилляции и недостаточный выход БАВ, деструктуризация БАВ в хамазулен.

Известен способ получения экстракта из растительного сырья (Патент на полезную модель Республики Казахстан №2774, МПК А61К 36/282, опубл. 14.05.2018 г.) Он включает использование в качестве растительного сырья траву полыни Гмелини (*Artemisia gmelinii*), ее измельчение до размера не менее 3 мм, экстракцию в перколяторе раствором 70% этанола в течение 72 часов в соотношении растительное сырьё : раствор этанола 1:1 при температуре не выше 25°C без принудительного перемешивания, отделение вытяжки от шрота с его отжимом, отстаивание при температуре не выше 8°C в течение 24 часов, отделение балластных масс от экстракта трехступенчатой фильтрацией с размером пор фильтров: 1,0 мкм, 0,5 мкм, 0,65/0,45 мкм).

Недостатком известного способа является недостаточный выход БАВ, сложность, энергозатратность, и трудоёмкость очистки.

В качестве наиболее близкого аналога выбран способ получения экстракта из растительного сырья (Патент РФ на изобретение № 2425094, МПК С11В 1/04, опубл. 10.04.2011). Он включает использование растительного сырья в виде высушенных молодых побегов можжевельника сибирского, измельчение растительного сырья до размера частиц 100-200 мк, смачивание измельчённого сырья 40% раствором этанола в соотношении сырьё: раствор этанола 1:10 и растирание смоченного сырья в течение 15 мин, добавление экстрагента в виде кукурузного масла в соотношении сырьё: экстрагент 1:5, экстракцию в ультразвуковой установке с частотой 37 кГц, при температуре 50-55°C в течение 3 часов, отделение экстракта от шрота центрифугированием.

Недостатком известного способа является недостаточная сохранность БАВ при экстракции и

высокое количество балластных веществ в экстракте, а также высокие энергозатраты на тонкое измельчение сырья и на его растирание.

Задачей полезной модели является создание способа получения экстракта из растительного сырья, позволяющего расширить ассортимент экстрактов из местного растительного сырья, позволяющего сохранить биологически активные вещества в экстракте и обеспечивающего получение экстракта с антибактериальной активностью.

Техническим результатом полезной модели является расширение ассортимента растительных экстрактов из местного растительного сырья, повышение антибактериальной активности и сохранение БАВ.

Для достижения технического результата в способе получения экстракта из растительного сырья, включающий измельчение растительного сырья, смачивание измельченного растительного сырья раствором этанола, экстракцию раствором этанола и очистку вытяжки от шрота, согласно полезной модели, в качестве растительного сырья используют листья и/или стебли и/или цветки аянии кустарничковой (*Ajania fruticulosa*) и/или аянии щитковой (*Ajania fastigiata*), а измельчение сырья осуществляют до размеров 5 мм, далее осуществляют смачивание 50-90% раствором этанола в соотношении сырьё: раствор этанола 1: (1-10) при температуре не выше 30°C в течение 12-24 часов, экстракцию осуществляют в ультразвуковой установке 50-90% раствором этанола в соотношении сырьё и экстрагент 1: 1-10 с частотой ультразвукового воздействия 20-40 кГц в течение 30-60 минут, после очистки вытяжки от шрота осуществляют удаление экстрагента из вытяжки до состояния густого или сухого экстракта.

В предпочтительном варианте осуществления в качестве ультразвуковой установки используют ультразвуковую ванну.

Помимо этого, очистку вытяжки от шрота осуществляют центрифугированием с последующей ее фильтрацией.

Кроме того, удаление экстрагента проводят в роторном испарителе под вакуумом при температуре 40°C и давлении 3,5 кПа.

Аяния кустарничковой (*Ajania fruticulosa*) и аяния щитковой (*Ajania fastigiata*) широко распространены в степях северного, центрального и восточного Казахстана, в горах и на склонах Алтая. Они имеют богатый состав БАВ, содержат 1,8-цинеол, камфен, п-цимол, камфору (терпеноиды), а также другие флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, сесквитерпеновые лактоны.

Выбор ультразвуковой экстракции для извлечения БАВ позволяет извлечь большое количество БАВ за короткое время. При смачивании растительного сырья происходит проникновение растворителя в клетку и растворение БАВ, что облегчает дальнейшую экстракцию и увеличивает выход БАВ в экстракте. Время смачивания измельченного сырья является оптимальным и не позволяет перейти в экстракт балластные вещества из сырья. При времени смачивания меньше 12 часов в

экстракт не переходит необходимое количество БАВ, а при времени больше, чем 24 часа, в экстракт переходят некоторые балластные вещества.

Использование раствора этанола для смачивания и экстракции с концентрацией больше 90% приводит к его перерасходу, почти не повышая при этом выход БАВ в экстракте, а использование раствора этанола с концентрацией менее 50% не позволяет получить необходимое количество БАВ.

Показатели при ультразвуковом воздействии: частота 20-40 кГц, время ультразвукового воздействия 30-60 минут являются оптимальными с точки зрения увеличения выхода БАВ в экстракте, сохранения при этом БАВ и минимизации балластных веществ в экстракте, а также получения экстракта с высокой антибактериальной активностью.

В ультразвуковой ванне источники ультразвука расположены равномерно, и ультразвуковое воздействие на сырьё также осуществляется равномерно, что позволяет наиболее полно извлечь БАВ из всего объёма смеси лекарственного сырья и раствора этанола.

Способ получения экстракта осуществляют следующим образом.

Заготовленное в соответствии с требованиями надлежащего практики культивирования и сбора исходного сырья растительного происхождения GACP (Good Agricultural and Collection Practice for starting materials of herbal origin) лекарственное растительное сырьё (аяния кустарничковая и/или аяния щитковая в виде стеблей, листьев, цветков) измельчают в траворезке до размера не более 5 мм. Полученное измельченное сырьё загружают в экстрактор и добавляют 50-90%-ный раствор этанола в соотношении сырьё и раствор этанола 1: (1-10), смачивание осуществляют в течение 12-24 часа при температуре не выше 30°C. По истечении времени экстрактор переносят в ультразвуковую ванну, и осуществляют экстракцию 50-90% раствором этанола в соотношении сырьё и экстрагент 1: (1-10) в течение 30-60 минут с частотой ультразвукового воздействия 20-40 кГц при температуре не выше 30°C без принудительного перемешивания. Полученный экстракт сливают в ёмкость центрифуги, центрифугируют при 5000:10000 об/мин, очищая вытяжку от шрота. Вытяжку экстракта фильтруют, отделяя балластные вещества, шрот отжимают. Шрот и балластные вещества сбрасывают в приемник отходов. Жидкий экстракт аянии собирают в накопителе и удаление экстрагента проводят под вакуумом в роторном испарителе при температуре 30-50°C и давлении 3,5 кПа до состояния густого экстракта (содержание влаги не более 25%) или состояния сухого экстракта (содержание влаги не более 5%). Готовый продукт стандартизируют в соответствии с нормативными документами. Полученную субстанцию упаковывают в герметичный контейнер из светонепроницаемого материала и маркируют.

Пример 1

Заготовленное сырьё в виде стеблей, листьев, цветков аянии щитковой (*Ajania fastigiata*)

измельчали в траворезке до размера 5 мм. Полученное сырьё загружали в экстрактор и добавляли 50% раствор этанола в соотношении сырьё и раствор этанола 1:10, смачивание осуществляли в течение 12 часов при температуре 25°C. По истечении времени экстрактор перенесли в ультразвуковую ванну, и осуществляли экстракцию 50% раствором этанола в соотношении сырьё и экстрагент 1:10 в течение 30 минут с частотой ультразвукового воздействия 40 кГц при температуре 25°C без принудительного перемешивания. Полученный экстракт сливали в ёмкость центрифуги, центрифугировали при 5000:10000 об/мин, очищая вытяжку от шрота. Далее вытяжку фильтровали, отделяя балластные вещества, шрот отжимали. Шрот и балластные вещества сбрасывали в приемник отходов. Жидкий экстракт аянии собирали в накопителе и удаляли раствор этанола в роторном испарителе под вакуумом при температуре 40°C и давлении 3,5 кПа до состояния густого экстракта (до содержания влаги не более 25%). Готовый продукт стандартизовали в соответствии с нормативными документами. Дозирование продукта проводили в воздухонепроницаемые контейнеры из темного материала.

Готовый экстракт представляет собой вязкую массу зелено-коричневого цвета со специфическим запахом.

Полученный экстракт хранили при температуре 15-20°C для дальнейшего изучения антибактериальной и противогрибковой активности с применением метода микроразведений в соответствии с требованиями Европейского комитета по тестированию антимикробной активности (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST) [European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2003] и руководящих принципов Института клинических и лабораторных стандартов [Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2012].

Для исследования антибактериальной и антигрибковой активности экстракт *Ajania fastigiata* использовали референс-штаммы, полученные из Американской коллекции типовых культур (смотрите в таблицу 1).

Все использованные микробные культуры сначала субкультивировали на питательном агаре при 35°C в течение 18-24 ч или 30°C в течение 24-48 ч для бактерий и грибов соответственно.

Образцы, содержащие экстракт аянии щитковой *Ajania fastigiata*, растворяли в диметилсульфоксиде (DMCO) до 50 мг/мл. Микробные суспензии готовили в стерильном физиологическом растворе (0,85% NaCl) с оптической плотностью 0,5 McFarland стандартной шкалы. Исследуемые бактериальные суспензии помещали на чашки Петри с твердой питательной средой Мюллера-Хинтона (Mueller-Hinton), содержащей 1 мг/мл тестируемых соединений, а затем инкубировали при

температуре 37°C в течение 24 ч. Ингибирование роста микроорганизмов оценивали по сравнению с контрольной культурой, посеянной на питательную среду без исследуемых субстанций.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) исследуемого экстракта определяли методом двукратных микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтона (для бактерий) и RPMI 1640 бульон с MOPS (для грибов) в 96-луночных полистироловых планшетах. Конечные концентрации соединений колебались от 1000 до 7,81 мкг/мл. Микробные суспензии были приготовлены по вышеописанной схеме. Далее по 1 мкл бактериальной или грибковой суспензии добавляли в каждую лунку, содержащую 100 мкл бульона и различные концентрации исследуемых соединений. После инкубации МИК оценивали спектрофотометрическим путем

определения наименьшей концентрации соединений, вызывающих полное ингибирование роста бактериальной или грибковой тест-штамма.

Минимальная бактерицидная концентрация (МБК) или минимальная фунгицидная концентрация (МФК) определялась как самая низкая концентрация соединений, которая требуется для гибели определенных видов бактерий или грибов.

МИК определяли путем посева 5 мкл культур из каждой лунки с отсутствием роста при определении МИК с последующим высевом на соответствующую агаровую среду. Результат оценивали после инкубации в термостате при температуре 35±2°C в течение 24 часов. Самые низкие концентрации соединений без видимого роста оценивали, как бактерицидная /фунгицидная концентрации.

Таблица 1.

Микробные культуры	МИК (мг/мл)	МБК (МФК) (мг/мл)	МИК/МБК (МФК) (мг/мл)
Грамположительные бактерии			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5	5	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	5	10	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	1,25	2,5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	10	10	1
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	5	10	2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	5	10	2
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	5	5	2
Грамотрицательные бактерии			
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	2,5	5	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	2,5	5	2
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	10	20	2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10	20	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10	20	2
грибы			
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10	10	1
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	5	10	2
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	10	10	1
<i>Candida krusei</i> ATCC 14243	5	10	2
Примечание: >10- отсутствие активности, 5-10 – слабая активность, 2,5-5 – умеренно выраженная активность, <2,5 – выраженная активность.			

По результатам исследования установлено, что полученный экстракт обладает выраженным противомикробным действием по отношению к грамотрицательным штаммам *Staphylococcus aureus*, к грамположительным штаммам *Bordetella bronchiseptica* и *Klebsiella pneumoniae* проявляет умеренно выраженную активность, в отношении других грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий и грибов проявляет слабую активность.

Пример 2.

Заготовленное сырье в виде стеблей, листьев, цветков аянии кустарничковой *Ajania fruticulosa* измельчали до размера частиц 5 мм в траворезке. Полученное сырье загружали в ёмкость и добавляли 90% раствор этанола в соотношении сырье и раствор этанола 1:10, смачивание осуществляли в

течение 24 часов при температуре 30°C. По истечении времени ёмкость перенесли в ультразвуковую ванну, и осуществляли экстракцию 90% раствором этанола в соотношении сырье и экстрагент 1:10 в течение 60 минут с частотой ультразвукового воздействия 25 кГц при температуре 25°C без принудительного перемешивания. Полученный экстракт сливали в ёмкость центрифуги, центрифугировали при 5000:10000 об/мин, очищая вытяжку от шрота. Далее вытяжку фильтровали, отделяя балластные вещества, шрот отжимали. Шрот и балластные вещества сбрасывали в приемник отходов. Жидкий экстракт аянии кустарничковой собирали в накопителе и удаляли раствор этанола в роторном испарителе под вакуумом при температуре 40°C и давлении 3,5 кПа до состояния сухого экстракта

(содержание влаги не более 5%). Готовый продукт стандартизовали в соответствии с нормативными документами. Дозирование продукта проводили в воздухонепроницаемые контейнеры из темного материала.

Готовый экстракт представляет собой твердую массу зелено-коричневого цвета со специфическим запахом.

Антибактериальную активность определяли аналогично примеру 1.

Таблица 2.

Микробные культуры	МИК (мг/мл)	МБК (МФК) (мг/мл)	МИК/МБК (МФК) (мг/мл)
Грамположительные бактерии			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,62	1,25	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	1,25	2,5	2
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	1,25	2,5	2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,31	0,62	2
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	0,31	0,62	2
Грамотрицательные бактерии			
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	-
грибы			
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	20	20	1
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	5	20	4
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	10	20	2
<i>Candida krusei</i> ATCC 14243	2,5	10	4
Примечание: >10- отсутствие активности, 5-10 – слабая активность, 2,5-5 – умеренно выраженная активность, <2,5 – выраженная активность.			

По результатам исследования установлено, что экстракт *Ajania fruticulosa* проявляет выраженную антимикробную и антигрибковую активность по отношению ко всем штаммам грамположительных бактерий, к штаммам грамотрицательных бактерий активность отсутствует, к штаммам грибов *Candida krusei* проявляет выраженную активность, к *Candida parapsilosis* умеренно выраженную активность, к остальным штаммам грибов активность отсутствует.

Предлагаемый способ получения экстракта из аянии, демонстрирующий широкий спектр антибактериальной и противогрибковой активности могут быть использованы для разработки эффективных антибактериальных лекарственных средств.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

1. Способ получения экстракта из растительного сырья, включающий измельчение растительного сырья, смачивание измельченного растительного сырья раствором этанола, экстракцию раствором этанола и очистку вытяжки от шрота, **отличающийся** тем, что в качестве растительного сырья используют листья и/или стебли и/или цветки аянии кустарничковой (*Ajania fruticulosa*) и/или

аянии щитковой (*Ajania fastigiata*), измельчают сырье до размеров 5 мм, смачивают в 50-90% раствора этанола при соотношении сырье и раствор этанола 1:10 при температуре не выше 30°C в течение 12-24 часов, экстракцию осуществляют в ультразвуковой установке 50-90% раствором этанола при соотношении сырье и экстрагент 1:10 с частотой ультразвукового воздействия 20-40 кГц в течение 15-60 минут, после очистки вытяжки от шрота удаляют экстрагент из вытяжки до состояния густого или сухого экстракта.

2. Способ получения экстракта из растительного сырья по п.1, **отличающийся** тем, что в качестве ультразвуковой установки используют ультразвуковую ванну.

3. Способ получения экстракта из растительного сырья по п.п.1 или 2, **отличающийся** тем, что очистку вытяжки от шрота осуществляют центрифугированием и последующей ее фильтрацией.

4. Способ получения экстракта из растительного сырья по любому из пунктов 1-3, **отличающийся** тем, что удаление экстрагента проводят в роторном испарителе под вакуумом при температуре 30-50°C и давлении 3,5 кПа.

7449

Верстка Д. Женысова
Корректор Б. Омарова