



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.20

(21) Номер заявки
201800259

(22) Дата подачи заявки
2018.04.09

(51) Int. Cl. **A61K 36/53** (2006.01)
B01D 11/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ТИМЬЯНА ПОЛЗУЧЕГО (THYMUS SERPYLLUM L.S.I.), ОБЛАДАЮЩЕГО АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ДЕЙСТВИЕМ В ОТНОШЕНИИ HELICOBACTER PYLORI

(43) 2019.10.31

(96) KZ2018/017 (KZ) 2018.04.09

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**НЕКОММЕРЧЕСКОЕ
АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАРАГАНДЫ" (KZ)**

(72) Изобретатель:
**Оразбаева Перизат Зарухановна,
Шакаримова Куаныш Казбековна,
Ивасенко Светлана Александровна,
Ахметова Сауле Балтабаевна, Лосева
Ирина Викторовна (KZ)**

(56) US-A-5472695

ALEKSANDRA A. JOVANOVIĆ et al.
Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from
thymus serpyllum and its antioxidant activity, Hem.
Ind., 2016, vol. 70(4), pp. 391-398

ROBEIRO A.R. et al. Gastroprotective effects
of thymol on chronic ulcers in rats: The role
of prostaglandins, ATP-sensitive K(+) channels and
gastric mucus secretion., Chem. Biol. Interact,
25.01.2016, vol. 244, pp. 121-8, реферат

JPH-A-0687757

ANNA MALM et al. Anti-Helicobacter pulori
activity in vitro of chamomile flowers, coneflower
herbs, peppermint leaves and thyme herbs - a
preliminary report. Curr. Issues Pharm. Med. Sci., vol.
28, No. 1, pp. 30-32

(57) Изобретение относится к области медицины, а именно к способу получения средства растительного происхождения, обладающего выраженным антибактериальным действием в отношении *Helicobacter pylori*, которое может быть использовано в качестве субстанции для создания лекарственных средств и препаратов для лечения и профилактики *Helicobacter pylori*-ассоциированных заболеваний. Сухой метанольный экстракт тимьяна ползучего, полученный с применением ультразвуковой экстракции не обладает мутагенным действием, проявляет дополнительные биологические свойства: антимикробное и отхаркивающее. Технический результат заявляемого изобретения достигается тем, что осуществляют двукратную ультразвуковую экстракцию воздушно-сухого сырья: листьев, цветочных корзинок и тонких стеблей тимьяна ползучего, произрастающего на территории Казахстана, измельченного до размеров 2-3 см, смесью метанол:вода в соотношении 7:3 без замачивания при соотношении сырья и указанной смеси 1:20 на ультразвуковой установке при частоте ультразвукового излучения 40 кГц, при температуре 20-22°C в течение 30 мин, после чего полученные жидкие экстракты фильтруют, объединяют и упаривают на ротационном испарителе досуха. Предлагаемый способ получения экстракта из тимьяна ползучего за счет применения ультразвуковой экстракции характеризуется высокой производительностью технологического процесса, низким расходом экстрагента, исключением трудоемких и времязатратных процедур, что делает его доступным, рациональным и экономичным.

Изобретение относится к области медицины, а именно к способу получения средства растительного происхождения, обладающего выраженным антибактериальным действием в отношении *Helicobacter pylori*, которое может быть использовано в качестве субстанции для создания лекарственных средств и препаратов для лечения и профилактики *Helicobacter pylori*-ассоциированных заболеваний. Предложен способ получения сухого экстракта тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.s.I.), произрастающего на территории Казахстана, с применением ультразвуковой экстракции растительного сырья 70%-ным метиловым спиртом, с последующим упариванием растворителя на ротаторном испарителе. Сухой метанольный экстракт тимьяна ползучего, полученный с применением ультразвуковой экстракции не обладает мутагенным действием, проявляет дополнительные биологические свойства: антимикробное и отхаркивающее.

Аналоги по назначению.

1. Стандартная тройная терапия антибиотиками амоксициллин + кларитромицин + нитроимидазол. Согласно Клиническому протоколу диагностики и лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки одобренные Объединенной комиссией по качеству медицинских услуг Министерства здравоохранения Республики Казахстан (от 29 июня 2017 г. Протокол № 24) рекомендуемые схемы эрадикации *H. pylori*.

Терапия первой линии (10-14 дней):

3-компонентная схема: ингибиторы протонной помпы (ИПП)+амоксициллин+кларитромицин; квадротерапия без висмута: ИПП+амоксициллин+кларитромицин+нитроимидазол.

Терапия второй линии (10-14 дней):

3-компонентная схема: ИПП+амоксициллин+фторхинолон; квадротерапия без висмута: ИПП+амоксициллин+кларитромицин+нитроимидазол; квадротерапия с висмутом: ИПП+амоксициллин+кларитромицин+висмута трикалиядигидрат.

Противомикробные препараты, применяющиеся при язвенной болезни, ассоциированной с *H. pylori*:

Амоксициллин - таблетки, в том числе покрытые оболочкой, диспергируемые; капсулы 500 мг, 1000 мг. Принимать перорально 1000 мг 2 раза в сутки.

Полусинтетический антибиотик группы пенициллина широкого спектра действия, активен в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Применяется в сочетании с противоязвенными препаратами при язвах желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с хеликобактерной (*Helicobacter pylori*) инфекцией [Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. М.: ООО "Издательство Новая Волна", 2005. С. 777].

Кларитромицин - таблетки, в том числе с модифицируемым высвобождением 500 мг. Принимать перорально 500 мг 2 раза в сутки.

Полусинтетический антибиотик, близкий по строению к эритромицину -6-О-метилэритромицин. Обладает широким спектром действия, активен в отношении грамположительных (стафилококки, стрептококки, листерии, коринебактерии) и грамотрицательных (менингококки, гемофильная палочка, кампилобактер, *Helicobacter pylori* и др.) бактерий, некоторых анаэробов (клостридии, бактероиды, пептококки) и др. [Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. М.: ООО "Издательство Новая Волна", 2005. С. 811].

Метронидазол - таблетки 250 мг, при квадротерапии с висмутом применяется по 250 мг перорально 4 раза в сутки, при тройной терапии на основе кларитромицина: 500 мг перорально 2 раза в сутки.

Синтетический противопаразитарный и противомикробный препарат. Обладает широким спектром действия в отношении простейших (*Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, лямблий), облигатных анаэробных бактерий (споро- и неспорообразующих бактероидов, клостридий, пептококков, пептострептококков), а также *Helicobacter pylori*. Метронидазол широко применяется для лечения гастродуоденальных язв, ассоциированных с *H. pylori* [Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. М.: ООО "Издательство Новая Волна", 2005. С. 905-906].

Недостатки аналога по назначению, кроме сложной и продолжительной схемы лечения, а также побочных действий стандартной тройной терапии эрадикации *Helicobacter pylori* антибиотиками амоксициллин + кларитромицин + нитроимидазол, основным недостатком является снижение ее эффективности на 40% из-за повышения устойчивости бактерии к антибактериальным препаратам, главным образом, к кларитромицину, поэтому в настоящее время ведется поиск более эффективных альтернативных терапевтических подходов, например фитотерапия [Papastergiou V., Georgopoulos S.D., Karatapanis S. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: past, present and future//World J.Gastrointest. Pathophysiol. 2014. № 5. P. 392-399].

2. Средство для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки с эрадикацией *Helicobacter pylori*, протекающей на фоне хронических заболеваний печени, представляет собой сбор 24 лекарственных растений, включающий траву золототысячника зонтичного, траву тысячелистника обыкновенного, траву зверобоя продырявленного, корни одуванчика лекарственного, корневища с корнями аира, корневище кровохлебки, листья эвкалипта, цветы пижмы, траву полыни горькой, рыльца кукурузные, цветки бессмертника песчаного, траву тимьяна ползучего, листья брусники, цветки бузины черной,

семя льна, цветки ромашки лекарственной, донник лекарственный, корневище лапчатки прямостоячей, цветки календулы лекарственной, листья мяты перечной, шалфей лекарственный, крапиву двудомную, цветки липы, толокнянку обыкновенную в определенном массовом соотношении. Смесь измельчают до порошкообразной консистенции, затем 2/3 чайной ложки заваривают на 300 мл кипятка, настаивают 15 мин. Принимают по 100 мл три раза в день после еды при нормальной и повышенной кислотности, а при пониженной - до еды в течение одного-полутора месяцев [патент RU 2274467 С2 Колосовский Э.Д., Радченко В.Г., Шабров А.В., Рубцова Н.В., Радченко Д.В.; заявл. 19.07.2004; опубл. 20.04.2006].

Недостатки аналога по назначению - в состав средства входят 24 лекарственных растения, в том числе и трава тимьяна ползучего, очень сложный состав, средство применяется в составе комбинированной терапии с метронидозолом.

Близким аналогом по составу и биологическому действию является

1. Сухие этилацетатный, этанольный 99,8%, этанольный 96% и этанольный 70% экстракты воздушно-сухой травы тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris* L.), приобретенного у фармацевтической компании Kawon (Польша) сертифицированной по GMP и ISO 9002, полученные с использованием способа мацерации при комнатной температуре (около 25°C) в течение 48 ч, соотношение сырья:экстрагент 1:10. Полученные экстракты фильтровали, затем растворители упаривали на ротаторном испарителе при температуре ниже 50°C. Этанольный 70% экстракт, выпаривали на ротаторном испарителе и полученный остаток замораживали до -50°C, а затем лиофилизировали. Исследовано антибактериальное действие полученных сухих экстрактов в отношении эталонного штамма *Helicobacter pylori* ATCC 43504. Установлено, что полученные экстракты обладают перспективным антибактериальным действием в отношении *Helicobacter pylori* и для этилацетатного экстракта минимальная ингибирующая концентрация (MIC) составила 15,6 мг/мл и минимальная бактерицидная концентрация (MBC) составила 125 мг/мл, для этанольного 99,8% экстракта - MIC 31,3 мг/мл и MBC 250 мг/мл, для этанольного 96% экстракта - MIC 31,3 мг/мл и MBC 250 мг/мл и для этанольного 70% экстракта - MIC 62,5 мг/мл и MBC 125 мг/мл [Malm A., Glowniak-Lipa A., Korona-Glowniak I., Baj T. Anti-*Helicobacter pylori* activity in vitro of chamomile flowers, coneflower herbs, peppermint leaves and thyme herbs - a preliminary report//Curr. Issues Pharm. Med. Sci. 2015. V. 28, № 1. P. 30-32].

Недостатки аналога по составу и биологическому действию - применяемый способ получения экстрактов - мацерация (48 ч) и лиофильная сушка (12 ч), являются многоступенчатыми, трудоемкими и времязатратными. Выходы экстрактов тимьяна обыкновенного авторами не указаны. Полученные экстракты обладают сравнительно невысоким антибактериальным действием в отношении *Helicobacter pylori*.

Тимьян ползучий (*Thymus serpyllum* L.s.l.) - многолетний стелющийся полукустарничек с сильным приятным запахом, относится к семейству яснотковых (Lamiaceae), евразийский вид, имеет дизъюнктивный ареал, состоящий из западного и восточного участков. Встречается в умеренном климате Евразии, от Скандинавии до Средиземноморья и от Британских островов до Восточной Сибири.

Британская травяная фармакопея классифицирует тимьян ползучий как лекарственное растение и рекомендует для лечения бронхита, бронхиального катара, коклюша и острого фарингита [The British Pharmacopoeia, Commission Secretariat of the Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, 2015.].

Трава тимьяна ползучего включена в государственные Фармакопеи Российской Федерации, республики Казахстан и в официальной медицине применяется как лекарственное растительное сырье, обладающее антибактериальным, вяжущим, противовоспалительным, успокаивающим, противосудорожным, отхаркивающим, спазмолитическим, желчегонным, болеутоляющим, мочегонным, ранозаживляющим и глистогонным действием, используется в виде отваров и настоев [государственная Фармакопея СССР. Т. XI, вып. 2. Москва, 1990. С. 60.; государственная Фармакопея Республики Казахстан. Т. 2. Астана, 2009. 802 с.].

В фармацевтической промышленности трава тимьяна ползучего используется при производстве галеновых препаратов (настоек, жидких экстрактов), которые являются источником лекарственных средств, применяемых в терапии заболеваний верхних дыхательных путей в качестве отхаркивающего средства [ФСП 42-2627-08 "Чабреца экстракт жидкий субстанция" ОАО "Фармстандарт-Томскхимфарм"//Введ. 29.12.2008. М., 2008. С. 14].

Жидкий экстракт травы тимьяна ползучего входит в состав комплексных препаратов "Пертуссин", "Мелрозум", "Коделак® бронхо с чабрецом", "Стоптуссин-Фито", которые производятся в виде сиропа или эликсира и применяются в качестве отхаркивающего средства в комплексной терапии острых респираторных заболеваний, трахеитов, бронхитов, а также при коклюше у детей [Государственный реестр средств. Т. 1: Типовые клинико-фармакологические статьи. Официальное издание (по состоянию на 25.04.2012 г.). М., 2012; Машковский, М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд., перераб., испр. и доп. М.: ООО "Издательство Новая Волна", 2005. 1200 с.].

Известны способы получения жидких, густых и сухих экстрактов тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.s.l.), обладающих различными биологическими свойствами.

Способ 1. В настоящее время в фармацевтической промышленности для получения жидкого экстракта тимьяна ползучего используют классический метод реперколяции. Применяется способ получе-

ния отхаркивающего средства, экстракта чабреца жидкого, заключающийся в экстракции растительного сырья - травы чабреца 30% спиртом этиловым в соотношении 1:1. В экстрагент добавляют глицерин в количестве 10% от массы сырья. В качестве способа экстрагирования используют реперколяцию в модификации ВНИИФ. Процесс проводят в батарее из трех диффузоров. Измельченное сырье укладывают поровну в 3 перколятора, экстрагент делят на три равные части. Первую порцию сырья экстрагируют чистым экстрагентом (смесь глицерина и 30% этилового спирта), а каждую последующую (вторую, третью) экстрагируют вытяжкой, полученной при экстрагировании предыдущей порции сырья. Готовые порции вытяжки получают из третьего диффузора. Все три порции готовой вытяжки смешивают, отстаивают при температуре не выше 10°C не менее двух суток. Процесс экстрагирования занимает 30 ч, отстаивание и фильтрация занимают еще 2,5 суток. Итого продолжительность технологического процесса получения одной серии экстракта чабреца жидкого занимает 90 ч или 3,75 суток. Получают прозрачную, бурюю жидкость с содержанием спирта не менее 22%, плотность не более 1.01, экстракционных веществ 8% [Муравьев И.А. Технология лекарств. В 2 т. М.: Медицина, 1980. Т. 1. С. 205].

Недостатки способа - применяемая технология является многоступенчатой, трудоемкой и времязатратной (90 ч или 3,75 суток). "Чабреца экстракт жидкий" зарегистрирован как отхаркивающее средство растительного происхождения [ЛСР-002826/07 от 30.10.2017; ФСП 42-2627-08 "Чабреца экстракт жидкий субстанция"]. Изучение антибактериального действия в отношении *Helicobacter pylori* в планы авторов не входило.

Способ 2. Ввиду недостатков технологии, применяемой на производстве, исследователи занимаются совершенствованием технологии получения жидкого экстракта чабреца. Так, Назаровым Б.В. предложено увеличить концентрацию спирта этилового от 30 до 70% с добавлением глицерина и проводить экстракцию сырья чабреца быстротекущей реперколяцией, что способствует более полному извлечению биологически активных веществ и сокращению экстракционного процесса более чем в два раза [Назаров, Б.В. Изучение процесса экстрагирования действующих веществ чабреца и тимьяна. Автореф. дисс. канд. фармацевт. наук/Б.В. Назаров. Тарту. 1963. 23 с.].

В Пятигорском фармацевтическом институте была разработана технология получения жидкого экстракта чабреца, основанная на теории производства жидких экстрактов с максимальным истощением лекарственного растительного сырья за счет увеличения соотношения сырья и экстрагента. Разработанная технология основана на увеличении количества перколяторов до 7 и изменении соотношения сырья:экстрагент (1:1,93), что позволяет наиболее полно экстрагировать сырье чабреца [Алаева Н.А. Рациональное использование сырья в производстве экстракта чабреца жидкого//Актуальные вопросы фармации и экспериментальной медицины: Тез. докл. науч. конф. молодых ученых и специалистов Пятигорского фармацевт. ин-та. Пятигорск, 1985. С. 41].

Н.А. Зыковой и И.А. Муравьевым на той же базе была разработана новая ресурсосберегающая технология получения жидкого экстракта чабреца, основанная на увеличении соотношения сырья и экстрагента 1:1,66 и использования батареи из 6 диффузоров, что позволило им увеличить эффективность экстракции до 80%. При этом снижается расход растительного сырья со 100 до 60 кг на каждые 100 л жидкого экстракта при сохранении установленных норм качества. Ими же была предложена технология получения полифракционного экстракта чабреца. В качестве экстрагентов были предложены 96% спирт этиловый и вода дистиллированная. При этом первый экстрагент достаточно полно извлекал эфирное масло и сумму тритерпеновых соединений, а второй - сумму фенольных соединений. При изучении оптимальных условий экстракции установили преимущество дробного использования экстрагента при производстве полифракционного экстракта в четыре ступени [Зыкова Н.А. Совершенствование существующего и разработка нового экстракционного препарата травы чабреца: автореф. дис. канд. фарм. наук: 15.00.01/Н.А. Зыкова. Пятигорск. 1990. 22 с.; Оптимизация технологии и анализа экстракта чабреца жидкого/В.Г. Беликов [и др.]/Материалы второго научного конгресса "Традиционная медицина: теоретические и практические аспекты". Ч. 1. 1996. С. 66].

Алаева-Зыкова Н.А. и Пшуков Ю.Г. разработали ресурсосберегающую технологию получения жидкого экстракта, основанную на использовании при экстрагировании батареи из 6 диффузоров пятью ступенями при соотношении фаз 1:1,992. Проведенная ими сравнительная оценка качества жидких экстрактов полученными разработанным и промышленным способами показало их равноценность [Алаева-Зыкова, Н.А. Разработка ресурсосберегающей технологии экстракта чабреца жидкого/Н.А. Алаева-Зыкова, Ю.Г. Пшуков//Фармация. 1989. № 5. С. 22-25].

Старчак Ю.А. провел комплекс экспериментальных исследований, который позволил выявить оптимальные параметры технологического процесса для получения жидкого экстракта чабреца с использованием вакуум-фильтрационного способа экстрагирования, обеспечивающего истощение сырья по флавоноидам до 87% [Старчак Ю.А. Фармакогностическое изучение растений рода Тимьян (*Thymus L.*) как перспективного источника получения фитопрепаратов. Диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук по специальности 14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия. Курск, 2016. 440 с.].

Недостатки способов - вышеперечисленные совершенствования способов получения чабреца экстракта жидкого не нашли применения в производстве, так как являются многоступенчатыми, трудоем-

кими и времязатратными. Чабреца экстракт жидкий зарегистрирован как отхаркивающее средство растительного происхождения (ЛСР-002826/07 от 30.10.2017; ФСП 42-2627-08 "Чабреца экстракт жидкий субстанция"). Изучение антибактериального действия в отношении *Helicobacter pylori* в планы авторов не входило.

Способ 3. В Вроцлавском медицинском университете (Польша) проведена водная экстракция тимьяна ползучего, приобретенного в польской фармацевтической компании "Kawon", сертифицированной по GMP и ISO 9002. Для получения сухого водного экстракта из тимьяна ползучего порошкообразный растительный материал (5 г) заливали дистиллированной водой, доведенной до кипения (350 мл), и перемешивали. Через 30 мин водный экстракт фильтровали через фильтры (Whatman № 1, Великобритания). Фильтрат (200 мл) подкисляли 1 мл муравьиной кислоты и наносили на октадецильную колонку (2×7 см, Bakerbond Octadecyl 40 µm Prep LC Packing, JT Baker, USA), который затем промывали 100 мл метанола (метод SPE). Элюат упаривали при 40°C (система Бюхи, Швейцария) досуха, получая сухой водный экстракт тимьяна ползучего. Изучена цитотоксическая активность сухого водного экстракта тимьяна ползучего в отношении двух линий клеток рака молочной железы человека [Berdowska I., Zielinski B., Fecka I., Kulbacka J., Saczko J., Gamian A. Cytotoxic impact of henolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells//Food chemistry. 2013. Vol. 141, № 2. P. 1313-1321].

Недостаток способа - использование октадецильной колонки, специализированной колонки для ВЭЖХ-анализа, значительно увеличивает расходы на получение сухого водного экстракта тимьяна ползучего и делает его дорогостоящим, многоступенчатым, трудоемким и времязатратным. Изучение антибактериального действия в отношении *Helicobacter pylori* в планы авторов не входило.

Способ 4. На кафедре биологии факультета естественных наук и искусств Университета Челал-Баяр (Маниса, Турция) получены предварительные результаты о влиянии густого метанольного экстракта *Thymus serpyllum*, приобретенного в фармацевтической компании ООО "Naturin" (Измир, Турция), на здоровые клетки и клетки рака молочной железы (MCF-7, MDA-MB-231). При этом отмечены перспективы разработки на основе густого метанольного экстракта тимьяна ползучего новых терапевтических препаратов для лечения рака молочной железы [Bozkurt E., Atmaca H., Kisim A., Uzunoglu S., Uslu R., Karaca B. Effects of Thymus serpyllum Extract on Cell Proliferation, Apoptosis and Epigenetic Events in Human Breast Cancer Cells//Nutrition and cancer-an international journal. 2012. V. 64, № 8. P. 1245-1250].

Недостатки способов - способ получения густого метанольного экстракта тимьяна ползучего авторами не описан. Изучение антибактериального действия в отношении *Helicobacter pylori* в планы авторов не входило.

Способ 5. Наиболее близким к заявленному изобретению является оптимизация метода экстракции травы тимьяна ползучего учеными Института по исследованию лекарственных растений "Доктор Иосиф Панчич" (Белград, Сербия), которыми были подобраны оптимальные условия ультразвуковой экстракции для извлечения полифенолов: время экстрагирования, соотношение сырье:экстрагент и размер частиц растительного сырья. Экстрагировали 30% этанолом. Для оптимизации процесса экстракции были изучены важные факторы, включая время экстракции (3, 7 и 10 мин), соотношение сырье:экстрагент (1:10, 1:20 и 1:30) и размер частиц растительного сырья (0,3, 0,7 и 1,5 мм), в качестве экстрагента использовали 30%-ный этанол при частоте ультразвукового излучения 20 кГц, при комнатной температуре.

Определены оптимальные параметры получения жидкого экстракта тимьяна ползучего, полученного ультразвуковой экстракцией растительного сырья 30%-ным этанолом в течение 3 мин в соотношении сырье:экстрагент 1:30, степень измельчения сырья 0,3 мм. Данные условия обеспечивают наибольшее содержание полифенолов в жидком экстракте тимьяна ползучего до 23,03 мг/л в пересчете на галловую кислоту и сравнительно высокую антиоксидантную активность [Jovanovic A.A., Dordevic V., Zdunic G.M., Savikin K.P., Pljevljakusic D., Bugarski B.M. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from Thymus serpyllum and its antioxidant activity//Hemijaska industrija. 2016. V. 70, № 4. P. 391-398].

Недостаток способа - ультразвуковая экстракция целенаправлена на получение жидкого экстракта тимьяна ползучего, содержащего наибольшее количество полифенолов и обладающего высокой антиоксидантной активностью. Исследование антибактериального действия жидкого 30%-ного этанольного экстракта тимьяна ползучего в отношении *Helicobacter pylori* не проводилось.

Задачей изобретения является разработка рационального и экономичного способа получения сухого метанольного экстракта из тимьяна ползучего с применением ультразвуковой экстракции, обладающего выраженным антибактериальным действием в отношении *Helicobacter pylori*, пригодного для промышленного производства сухого экстракта тимьяна ползучего - субстанции для создания лекарственных средств и препаратов для лечения и профилактики *Helicobacter pylori*-ассоциированных заболеваний.

Технический результат заявляемого изобретения достигается тем, что разработанный способ включает двукратную ультразвуковую экстракцию воздушно-сухого сырья травы тимьяна ползучего (листья, цветочные корзинки и тонкие стебли), произрастающего на территории Казахстана, измельченного до размера 2-3 см, проводят смесью метанол:вода в соотношении 7:3, без замачивания, соотношение сырья и растворителя 1:20, на ультразвуковой установке Ultrasonic cleaner Sonic-9 при частоте ультразвукового излучения 40 кГц, при комнатной температуре (20-22°C), в течение 30 мин, после ультразвуковой обработки жидкие экстракты фильтруют, объединяют и упаривают на роторном испарителе досуха, выход

ультразвукового экстракта тимьяна ползучего составляет 14,14% в пересчете на воздушно-сухое сырье, при этом установлено, что сухой метанольный экстракт тимьяна ползучего, полученный с применением ультразвуковой экстракции, обладает выраженным антибактериальным действием в отношении *Helicobacter pylori*, не проявляет мутагенного действия, также обладает дополнительными биологическими свойствами: антимикробным и отхаркивающим.

Пример 1. Оценка антибактериальной активности ультразвукового экстракта тимьяна ползучего в отношении *Helicobacter pylori*.

Изучение антибактериальной активности ультразвукового экстракта тимьяна ползучего в отношении эталонного штамма *Helicobacter pylori* ATCC 43504 проводили методом микроразведений в бульоне.

Экстракт, растворенный в диметилсульфоксиде (ДМСО), сначала разбавляли до концентрации (10 мг/мл) в бульоне Мюллера-Хинтона с 5% лошадиной сывороткой. Затем, используя один и тот же носитель, серийные двукратные разведения были сделаны для получения конечных концентраций тестируемого экстракта от 0,0024 до 5 мг/мл. Стерильные планшеты готовили путем дозирования 1 мл соответствующего разбавления испытуемых экстрактов в среде бульона на лунку. Затем 1 мл расплавленного 3% МН-агара с 5% сывороткой (поддерживали при 50°C на водяной бане до тех пор, пока она не была расплавлена в агаровую пластину). Планшет выдерживали при комнатной температуре до тех пор, пока агар не затвердел. Когда поверхность агара сушат, пластину инокулируют 5 мкл свежеприготовленного инокулята (с плотностью 3 по стандарту McFarland, 108 КОЕ/мл), используя режим многократного дозирования электронной пипетки. Используя ту же агаровую пластинку, проводили контроль стерильности, контроль роста и контроль ДМСО. Инокулированные агаровые пластины инкубировали при комнатной температуре до тех пор, пока инокулят не был поглощен агаром. После инкубации при 35°C в течение 72 ч в условиях микроаэрофильного состояния (5% O₂, 15% CO₂ и 80% N₂) конечная точка минимальной ингибирующей концентрации (МИК) регистрировалась как самая низкая концентрация экстракта, которая полностью ингибирует рост.

Минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) определяли путем субкультивирования 5 мкл микробной культуры из каждой лунки, которая демонстрировала ингибирование роста от последнего положительного и от контроля роста до рекомендованных пластин агара. Планшеты инкубировали при 35°C в течение 24 ч, а МБК/МИК определяли как самую низкую концентрацию экстрактов без роста микроорганизмов. Полученные результаты приведены в табл. 1.

По результатам исследования установлено, что ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего обладает выраженным антибактериальным действием в отношении *Helicobacter pylori*, минимальная ингибирующая концентрация (МИК) составляет 0,0625 мг/мл, минимальная бактерицидная концентрация (МБК) - 1,25 мг/мл.

Пример 2. Оценка антимикробной активности ультразвукового экстракта тимьяна ползучего.

Изучение антимикробной активности вышеуказанного образца проводилось по отношению к грамотрицательным бактериям (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus mirabilis* ATCC 12453), грамположительным бактериям (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Streptococcus mutans* ATCC 25175) и грибам (*Candida albicans* ATCC 102231, *Candida albicans* ATCC 2091, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida krusei* ATCC 14243) методом микроразведений с использованием раствора Mueller-Hinton.

Культуры штаммов содержались в 70% солевом бульоне Trypticase Soy до окончания исследования. Перед проведением экспериментов каждый штамм бактерий пассировали на свежем агаре Mueller-Hinton при 35°C в течение 24 ч. Экстракт, растворенный в диметилсульфоксиде (ДМСО), сначала разбавляли до концентрации 20 мг/мл в соответствующей питательной среде. Затем, используя раствор Mueller-Hinton, получили разные концентрации растительного экстракта от 0,156 до 20 мг/мл.

В стерильные 96-луночные полистирольные планшеты вносилось по 200 мкл приготовленного раствора. Свежие микробные культуры разводили в стерильном растворе натрия хлорида изотонического (0,85%) в соответствии со значением мутности 0,5 по стандарту McFarland и добавляли по 2 мкл в лунки для получения конечной концентрации 1,5×100 КОЕ/мл для бактерий.

В планшеты были дополнительно внесены раствор ДМСО (в концентрации 10%), положительный контроль (содержащий микроорганизмы без растительного материала) и отрицательный контроль (содержащий растительный материал без микроорганизмов).

Планшеты инкубировали при 35°C в течение 24 ч, а минимальные бактерицидные концентрации/минимальные ингибирующие концентрации (МБК/МИК) определяли на спектрофотометре Agilent Cary 8454 UV-Vis как соотношение самой низкой концентрации экстракта, вызывающей полную гибель микроорганизмов, к концентрации, задерживающей рост культур. Каждый эксперимент повторяли в трех повторностях. Полученные результаты представлены в табл. 2.

По результатам проведенного исследования установлено, что ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего обладает выраженным антимикробным действием по отношению к грамотрицательным

штаммам *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 в концентрации от 1,25 до 2,5 мг/мл и вызывает задержку роста культур *Bacillus cereus* ATCC 10876 в концентрации 2,5 мг/мл. Также экстракт тимьяна ползучего проявляет выраженное антимикробное действие по отношению к грамположительному штамму *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 в концентрации 1,25 мг/мл и вызывает задержку роста культур *Proteus mirabilis* ATCC 12453 в концентрации 2,5 мг/мл.

Пример 3. Оценка отхаркивающей активности ультразвукового экстракта тимьяна ползучего.

Для исследования отхаркивающего действия ультразвукового экстракта тимьяна ползучего использовали модель изучения моторной функции мерцательного эпителия пищевода лягушки по методике В.В. Гацура. Экспериментальная работа выполнена на осенних лягушках *Rana Temporanea*. Лягушку фиксировали на корковой пластинке брюшком вверх. 0,01 г ультразвукового экстракта тимьяна ползучего растворяли в 1 мл среды Игла (питательная среда для культивирования клеток и тканей, содержащая большой набор аминокислот), 0,07 мл сиропа Бронхикум С разводили в 1 мл среды Игла. На кончик языка наносили исследуемый настой в количестве 0,1 мл. Для регистрации движения ресничек мерцательного эпителия пищевода использовали шелковую нить размером 15 мм, которую по истечении 30 с после нанесения исследуемых настоев помещали у основания языка. По секундомеру замечали время, в течение которого заглатывалась нить. Регистрировали время, затраченное на перемещение нитки на 10 мм без настоя (контроль) и после нанесения исследуемого настоя.

Препаратом сравнения являлся сироп Бронхикум С - отхаркивающее средство растительного происхождения, который оказывает отхаркивающее, противовоспалительное, бронхолитическое, противомикробное действие, способствует снижению вязкости мокроты и ускорению ее эвакуации. 100 мл сиропа содержат 15 г жидкого экстракта травы тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris* L.), соотношение травы тимьяна к экстрагенту (1:2-2,5), экстрагент: р-р аммиака 10%, глицерол 85%, этанол 90%, вода.

Учитывая значительный разброс исходных скоростей движения мерцательного эпителия от одного животного к другому, нами произведен расчет коэффициента ускорения (КУ), как отношения скорости, полученной после аппликации исследуемого образца, к исходной. Уменьшение данного коэффициента говорит о повышении двигательной активности мерцательного эпителия (табл. 3).

Как видно из табл. 3, при сопоставимом значении коэффициента ускорения ультразвукового экстракта тимьяна ползучего и препарата сравнения испытуемый образец повышает двигательную активность мерцательного эпителия лягушки, следовательно, обладает отхаркивающим свойством.

Экспериментально установлено, что ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего обладает отхаркивающим действием, сопоставимым с препаратом сравнения - сиропом Бронхикум С.

Пример 4. Оценка мутагенных эффектов ультразвукового экстракта тимьяна ползучего.

Исследованию в стандартном тесте Эймса подлежал ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего в концентрациях 10; 100; 1000 и 10000 мкг/мл. В качестве тестерных штаммов микроорганизмов использовали *Salmonella typhimurium* TA 100 и TA 98. Испытание проводилось полуколичественным методом учета генных мутаций без метаболической активации. Наличие мутагенного эффекта у исследуемого экстракта учитывали по индукции обратных мутаций от аусотрофности по гистидину к прототрофности. В качестве позитивных контролей использовали мутаген прямого действия N-нитрозометилмочевину (НММ), вызывающий мутации замены пар оснований на штамме *Salmonella typhimurium* TA 100 и 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диокси-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-дiazопирен (ДЦДТДП), индуцирующий мутации по типу рамки считывания на штамме *Salmonella typhimurium* TA 98.

Использовали питательные среды и растворы: мясопептонный агар (МПА) 0,6%; МПА 2%; водный агар 2%; солевой концентрат; 20% раствор глюкозы; 1% раствор сернокислого магния; минимальный агар 1,5%; полужидкий минимальный агар 0,7%; раствор гистидина 2,5 мМ; раствор биотина 1,25 мМ; верхний полуобогатенный агар.

Бактериальные штаммы *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98 культивировали в (МПБ) при температуре от 37°C. Раствор исследуемого образца готовили в дистиллированной воде в стандартных концентрациях (10; 100 мкг/мл). Селективный полуобогатенный агар (0,6%) в пробирках плавил в водяной бане при 100°C и помещали в термостатируемую водяную баню при температуре 45-46°C. Вначале в пробирки с агаром вносили раствор исследуемого образца в используемых концентрациях (0,1 мл), затем в пробирки вносили 0,1 мл суспензии бактерий. После этого вносили 0,5 мл микросомальной активирующей смеси, быстро размешивали содержимое пробирки и выливали его на слой нижнего минимального агара на чашке Петри ровным тонким слоем. Чашку оставляли при комнатной температуре на 40 мин и после полного застывания агара переносили в термостат на 37°C. Учет результатов проводили через 48 ч инкубации при температуре 37°C.

В опыт включали варианты с полной микросомальной активирующей смесью (ПМАС) и неполной микросомальной активирующей смесью (НМАС). В состав первой входили: суспензия бактерий, исследуемый образец, гомогенат и кофакторы. В вариантах НМАС вместо кофакторов вносили соответствующий объем растворителя - воду. В контрольном варианте в слой верхнего полужидкого агара вместе с суспензией бактерий вносили микросомальную активирующую смесь, а также соответствующий объем растворителя образца. В качестве позитивного контроля использовали нитрозометилмочевину (НММ)

(100 мкг/чашку).

Бактерии обрабатывали раствором экстракта (растворитель - диметилсульфоксид) в стандартных концентрациях 10 и 100 мкг/чашку с системой метаболической активации и без метаболической активации. После инкубации подсчитывали количество ревертантных колоний у разных тестерных штаммов в сравнении с количеством спонтанных ревертантных вариантов негативного контроля (культуры, обработанные только растворителем). В качестве позитивного контроля использовали нитрозометилмочевину (100 мкг/чашку).

Превышение в числе колоний-ревертантов в полной микросомальной активирующей смеси говорит об эффективности функционирования системы микросомального окисления.

О выраженности токсического действия исследуемых биоконплексов определяем по выживаемости тестерных штаммов *Salmonella typhimurium* TA 100 *Salmonella typhimurium* TA 98. Согласно рекомендациям по проведению теста Эймса максимальная доза исследуемых соединений не должна подавлять рост тестерных бактерий более чем на 50% [Дурнев с соавт., 2003].

Учет генных мутаций (тест Эймса) считали полук количественным методом, и мутагенную активность засчитывали по кратности превышения числа индуцированных ревертантов над спонтанным фоном мутирования [Magon, Ames, 2003]. Для исключения артефактов в тесте Эймса в образцах определяли количественное содержание гистидина по методу, разработанному Ильинской с соавторами [Ильинская с соавт., 2006]. Результаты исследования мутагенной активности образца приведены в табл. 4.

В результате проведенного эксперимента выявлено, что число колоний-ревертантов в ПМАС с концентрациями экстракта 10 г/чашка, экстракта 100 г/чашка не превышало числа колоний-ревертантов по отношению к позитивному контролю.

Таким образом, по полученным данным у ультразвукового экстракта тимьяна ползучего не выявлено мутагенного эффекта.

Для определения ДНК-повреждающего эффекта использовали REC-тест, основанный на использовании штаммов *Escherichia coli*, дефектных по разным путям репарации: Wp2 ("дикий" тип), *Escherichia coli* polA (нарушен синтез ДНК-полимеразы I).

Репарационный тест на *Escherichia coli* является бактериальной тест-системой для учета дифференциальной выживаемости бактерий при действии соединений, индуцирующих в геноме *Escherichia coli* повреждения ДНК, репарируемые в ходе эксцизионной и пострепликативной репарации. Репарационный тест на *Escherichia coli* основан на регистрации дифференциальной выживаемости бактерий дикого типа и мутантных бактерий, дефектных по определенным этапам репарации ДНК. Бактерии обрабатываются тестируемым соединением с системой метаболической активации и без метаболической активации в жидкой среде. После инкубации регистрируется наличие бактериального роста у разных тестерных штаммов при одних и тех же концентрациях тестируемого соединения. В качестве тестерных организмов использовали штаммы *Escherichia coli* B/r WP2 (дикий тип по репарации ДНК) и WP67 (polA) (мутантный штамм, дефектный по репарации ДНК).

Исследование проводилось для выявления способности исследуемого образца индуцировать повреждение ДНК у индикаторных штаммов *Escherichia coli*. Бактерии *Escherichia coli* обрабатывали раствором образца (растворитель - диметилсульфоксид) в дозах 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,003125 мкг/мл. Негативный контроль обрабатывали только растворителем - диметилсульфоксидом. В качестве позитивного контроля использовали нафталин. Оптимальной дозой нафталена, вызывающей субингибирующий антимикробный эффект, оказалась доза 0,005 мкг/мл, так как 0,001, это конечная доза проявляющая бактериостатический эффект, выявлена в серии тестов при определении минимальной ингибирующей концентрации. Изучение прямого действия образца на популяцию бактерий оценивали по изменению оптической плотности бактериальной суспензии *Escherichia coli* при совместной инкубации с исследуемым образцом, и посевной дозы на плотные питательные среды Эндо, кровяной агар. Результаты оценивали по форме и размеру колоний, а также по наличию гемолиза, фенотипическим свойствам бактерий.

Установлено, что образец в исследуемых концентрациях не влияет на скорость роста клеток дикого и мутантного штаммов *Escherichia coli*. Добавление образца не приводило к изменению количества колоний, их формы, не повлияло на размер зон гемолиза. При этом нафталин в исследуемой концентрации ингибирует рост и гемолитические свойства мутантного штамма *Escherichia coli*.

В результате проведения репарационного теста на *Escherichia coli*, используя микроорганизм как бактериальную тест-систему для учета дифференциальной выживаемости бактерий при совместном культивировании образцов на наличие индуцирующих в геноме *Escherichia coli*, повреждений ДНК, ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего не индуцирует повреждений ДНК у *Escherichia coli*. Результаты испытания образца в батарее КСТ позволяют сделать заключение об отсутствии канцерогенной опасности. Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего не обладает мутагенной активностью.

Таким образом, предлагаемый способ получения ультразвукового экстракта из тимьяна ползучего за счет применения ультразвуковой экстракции характеризуется высокой производительностью технологического процесса, низким расходом экстрагента, исключением трудоемких и времязатратных процедур, что делает его доступным, рациональным и экономичным.

Способ может найти применение в фармацевтической промышленности для производства ультразвукового тимьяна ползучего - субстанции для создания лекарственных средств и препаратов для лечения и профилактики *Helicobacter pylori*-ассоциированных заболеваний.

Таблица 1

Результаты определения антибактериальной активности ультразвукового экстракта тимьяна ползучего в отношении *Helicobacter pylori*

Микроорганизмы	МИК мг/мл	МБК мг/мл
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504	0,0625	1,25
Примечание: > 10 – отсутствие активности, 5-10 – слабая активность, 2,5-5 – умеренно выраженная активность, < 2,5 – выраженная активность.		

Таблица 2

Результаты определения антимикробной активности ультразвукового экстракта тимьяна ползучего

Микроорганизмы	МИК мг/мл	МБК мг/мл
Грамположительные бактерии		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	1.25	1.25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	2.5	2.5
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC10240	1.25	2.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	1.25	1.25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	1.25	2.5
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	2.5	>20
Грамотрицательные бактерии		
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	10	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883	1.25	1.25
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC12453	2.5	2.5
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	5	10
Грибы		
<i>Candida albicans</i> ATCC102231	>20	10
<i>Candida albicans</i> ATCC2091	>20	10
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC22019	5	10
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	10	10
<i>Candida krusei</i> ATCC 14243	5	10
Стрептококки		
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	5	5
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	5	10
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	5	5
Примечание: > 10 – отсутствие активности, 5-10 – слабая активность, 2,5-5 – умеренно выраженная активность, < 2,5 – выраженная активность.		

Таблица 3

Результаты исследования отхаркивающей активности ультразвукового экстракта тимьяна ползучего

Образец	Коэффициент ускорения (КУ)	Увеличение двигательной активности
Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего	0,67	49 %
Препарат сравнения Бронхikum С	0,66	52,5 %

Таблица 4

Результаты исследования мутагенной активности ультразвукового экстракта тимьяна ползучего

Исследования влияния активности ультразвукового экстракта тимьяна									
Наименование	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100				<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98				
	Влияние на рост штамма количество КОЕ на чашку	в-во 1000 мкг/чашка	в-во 100 мкг/чашка	в-во 10 мкг/чашка	Контроль нитрозоэтилмочевина (НММ)	в-во 1000 мкг/чашка	в-во 100 мкг/чашка	в-во 10 мкг/чашка	НММ
Ультразвуковой экстракт тимьяна ползучего		6±1	6±1	8±1	14±1	7±1	5±1	9±1	14±1

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения экстракта из тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum* L.s.l.), обладающего антибактериальным действием в отношении *Helicobacter pylori*, отличающийся тем, что осуществляют двукратную ультразвуковую экстракцию воздушно-сухого сырья: листьев, цветочных корзинок и тонких стеблей тимьяна ползучего, произрастающего на территории Казахстана, измельченного до размеров 2-3 см, смесью метанол:вода в соотношении 7:3 без замачивания при соотношении сырья и указанной смеси 1:20 на ультразвуковой установке при частоте ультразвукового излучения 40 кГц, при температуре 20-22°C в течение 30 мин, после чего полученные жидкие экстракты фильтруют, объединяют и упаривают на ротационном испарителе досуха.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2