



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 60299

(13) C2

(51) 7 A61K35/78,31/195,31/495,A61P5/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОБРОБКИ НАСІННЯ ЄВГЕНІЯ ЯМБОЛАНА ЛАМАРК, СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ОКСАМАТУ НАТРІУ ТА ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ І ЛІКУВАННЯ ДІАБЕТУ ТА ЙОГО УСКЛАДНЕНЬ

1

2

(21) 98084216

(22) 03 02 1997

(24) 15 10 2003

(86) PCT/FR97/00207, 03 02 1997

(31) 96/01388

(32) 06 02 1996

(33) FR

(46) 15 10 2003, Бюл. № 10, 2003 р.

(72) Ракото Ратзімаманга Альберт, MG, Ракото Ратзімаманга Сюзанне, MG, Разоанаіво Філіп, MG, Лебоул Жан, FR, Провост Жан, FR, Рейздорф Даніель, FR

(73) ІНСТИТУТ МАЛГАШ ДЕ РЕШЕРШ АППЛИКЕ, MG, АВЕНТІС ФАРМА С А, FR

(56) FR A 2465484 27 03 1981

DE A 2159923 14 06 1973

(57) 1 Спосіб обробки насіння ЄВГЕНІЯ ЯМБОЛАНА ЛАМАРК шляхом його подрібнення та ізоляції суміші, що не містить поліфенольні та стерольні похідні, мацерації порошку нижчим аліфатичним спиртом у гарячому стані, фільтрації, виділення нерозчинного осаду, що не містить поліфенольні та стерольні сполуки, обробки нерозчинного осаду аміачним розчином, обробки аміачної суміші нижчим аліфатичним спиртом у гарячому стані, фільтрації, виділення нерозчинного осаду та просушки цього осаду, що являє собою суміш І

2 Спосіб обробки насіння за п. 1, який відрізняється тим, що насіння ЄВГЕНІЯ ЯМБОЛАНА ЛАМАРК висушують, ретельно подрібнюють та просяють, а отриманий порошок піддають наступній обробці

а) мацерації з розмішуванням у нижчому аліфатичному спирті при температурі в інтервалі 40-70 °С,

б) вакуум-фільтрації та виділенню нерозчинного осаду,

в) мацерації з розмішуванням нерозчинного осаду в нижчому аліфатичному спирті (1-4С) при температурі в інтервалі 40-70 °С,

г) вакуум-фільтрації та видаленню спиртових фаз, що містять головним чином небажані поліфеноли та стероли,

д) обробці нерозчинного осаду в аміачному розчині при температурі в інтервалі 10-30 °С,

е) обробці всієї вологої аміачної маси в розчині води з нижчим аліфатичним спиртом (1-4С) при температурі в інтервалі 40-70 °С,

ж) фільтрації та видаленню спиртового розчину,

з) промивці нерозчинного осаду нижчим аліфатичним спиртом (1-4С), фільтрації та видаленню спиртового розчину,

і) виділенню нерозчинного осаду та просушці суміші І

3 Спосіб за п. 2, який відрізняється тим, що на стадії а) використовують від 2 до 10 літрів нижчого аліфатичного спирту на 1 кг просіяного порошку

4 Спосіб за п. 2 або 3, який відрізняється тим, що на стадії а) використовують 5 літрів етанолу міцністю 93-95° по Гей-Люсаку при 60 °С протягом 1 години

5 Спосіб за будь-яким з пп. 2-4, який відрізняється тим, що фільтрацію на стадії б) та г) здійснюють під вакуумом 40 кПа

6 Спосіб за будь-яким з пп. 2-5, який відрізняється тим, що на стадії в) використовують принаймні від 2 до 10 літрів нижчого аліфатичного спирту на 1 кг вихідного просіяного порошку

7 Спосіб за будь-яким з пп. 2-6, який відрізняється тим, що на стадії в) використовують 4 літри етанолу міцністю 93-95° по Гей-Люсаку при температурі 60 °С протягом 1 години

8 Спосіб за будь-яким з пп. 2-7, який відрізняється тим, що на стадії д) на 1 кг вихідного просіяного порошку використовують 750-1250 мл аміачної води

9 Спосіб за будь-яким з пп. 2-8, який відрізняється тим, що на стадії д) на 1 кг вихідного просіяного порошку використовують 1 літр аміачної води, що містить 350 мл 28 %-го підрату окису амонію, та обробку здійснюють при температурі близько 20 °С протягом 10-30 годин

10 Спосіб за будь-яким з пп. 2-9, який відрізняється тим, що на стадії е) вологу аміачну масу, отриману з 1 кг вихідного просіяного порошку, розміщують в 2-10 літрах розчину води з нижчим аліфатичним спиртом

11 Спосіб за будь-яким з пп. 2-10, який відрізняється тим, що на стадії е) здійснюють

(13) C2

(11) 60299

(19) UA

обробку в 5 літрах суміші етанол-вода (75/25 за об'ємом) при температурі 60 °С протягом 1 години.
12 Спосіб за будь-яким з пп 2-11, який відрізняється тим, що на стадії з) промивку здійснюють 500-1500 мл нижчого аліфатичного спирту на 1 кг вихідного просіяного порошку.

13 Спосіб за будь-яким з пп 2-12, який відрізняється тим, що на стадії з) промивку здійснюють 1 літром етанолу, а фільтрацію здійснюють через міткаль під вакуумом приблизно 80 кПа.

14 Спосіб за будь-яким з пп 2-12, який відрізняється тим, що на стадії і) сушіння здійснюють на відкритому повітрі, в тіні.

15 Спосіб за п 1, який відрізняється тим, що суміш І піддають обробці розчином води з нижчим аліфатичним спиртом, фільтрації, частковому концентруванню фільтрату, очистці неполярними адсорбуючими смолами, частковому концентруванню, центрифугуванню, ультрафільтрації та виділенню суміші ІІ.

16 Спосіб приготування суміші ІІ за п 15, який відрізняється тим, що суміш І, одержану згідно з п 1, піддають наступним операціям:

к) обробці суміші І, одержаної згідно з п 1, за допомогою розчину вода-нижчий аліфатичний спирт (1-4С)

л) відстоюванню, а потім відкачці верхньої фази, яка фільтрується, утворюючи фільтрат 1, та обробці нижньої фази водою, яка також фільтрується, утворюючи фільтрат 2, потім об'єднанню фільтратів 1 і 2 та концентруванню у водній фазі,

м) обробці неполярною адсорбуючою смолою та потім фільтрації,

н) концентруванню фільтрату, фільтрації та потім ультрафільтрації,

о) ліофілізації та виділенню екстракту ІІ.

17 Спосіб за п 16, який відрізняється тим, що на стадії к) використовують 10-25 літрів розчину вода-нижчий аліфатичний спирт (95/5 - 90/10 за об'ємом) на 1 кг суміші І.

18 Спосіб за п 16 або 17, який відрізняється тим, що на стадії к) використовують 18 літрів розчину вода-етанол (17,7/0,93 за об'ємом).

19 Спосіб за будь-яким з пп 16-18, який відрізняється тим, що на стадії л) верхню фазу фільтрують через міткаль та на 1 кг суміші І додають від 10 до 25 літрів води до нижньої фази, яку фільтрують через фритту.

20 Спосіб за будь-яким з пп 16-19, який відрізняється тим, що на стадії л) концентрування здійснюють звичайно вакуумом 0,4 кПа.

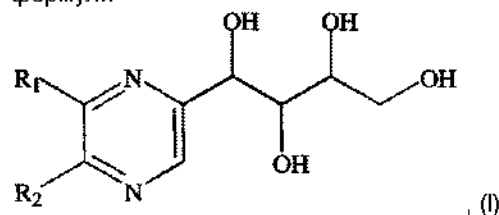
21 Спосіб за будь-яким з пп 15-20, який відрізняється тим, що на стадії м) використовують смоли S861 або смоли типу XAD фірми Rhom та Hass, і фільтрацію здійснюють через фритту.

22 Спосіб за будь-яким з пп 16-21, який відрізняється тим, що на стадії м) концентрування здійснюють в термосифонному концентраторі при температурі 35 °С під вакуумом 0,4 кПа.

23 Спосіб за будь-яким з пп 16-22, який відрізняється тим, що на стадії н) послідовно

здійснюють 3 ультрафільтрації через патронний фільтр 10 кДа, 3 кДа і 1 кДа.

24 Спосіб приготування оксамату натрію та сполук формули



в якій або R₁ являє собою атом водню, а R₂ являє собою ланцюг формули

-CH₂-CH(OH)-CH(OH)-CH₂OH (A) або

-CH(OH)-CH(OH)-CH(OH)-CH₂OH (B),

або R₁ являє собою ланцюг формули (A), а R₂ являє собою атом водню, який відрізняється тим, що суміш ІІ, одержану згідно з п 15, піддають наступним операціям:

п) хроматографії суміші ІІ, одержаної згідно з винаходом на колонці з кізельгуром, виділенню фракцій, що містять 4 продукти, та об'єднанню цих фракцій в одну фракцію,

р) хроматографії раніше отриманої фракції на колонці з сефадексом для отримання оксамату натрію, сполуки формули (I), де R₁ являє собою атом водню, а R₂ являє собою ланцюг формули (B), і суміші сполуки формули (I), де R₁ являє собою атом водню, а R₂ являє собою ланцюг формули (A), та компонента формули (I), де R₁ являє собою ланцюг формули (A), а R₂ - атом водню,

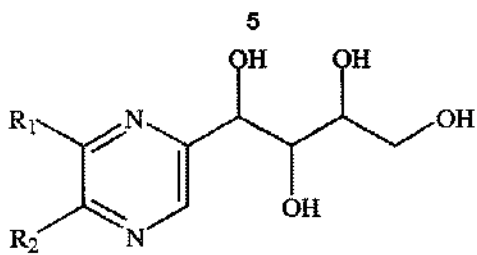
с) необов'язково, хроматографії суміші сполуки формули (I), де R₁ являє собою атом водню, а R₂ - ланцюг формули (A), і сполуки формули (I), де R₁ являє собою ланцюг формули (A), а R₂ - атом водню, типу ВЕРХ (високоєфективної рідинної хроматографії).

25 Спосіб за п 24, який відрізняється тим, що хроматографію на стадії п) здійснюють на колонці R₁CHEM ELUT фірми Prolabo, насичений водою, а потім елюйований послідовно гептаном, сумішшю гептан-етилацетат (50/50 за об'ємом), сумішшю етилацетат-н-бутанол (95/5, 90/10, 80/20, 50/50, 20/80, а потім 0/100 за об'ємом) та сумішшю н-бутанол-вода (98/2 та 95/5 за об'ємом).

26 Спосіб за п 25, який відрізняється тим, що хроматографію на стадії р) здійснюють сумішшю вода-етанол (50/50 за об'ємом).

27 Спосіб за п 25, який відрізняється тим, що хроматографію на стадії с) здійснюють на колонці YMC 18ODS-AQ фірми AIT з використанням як елюента суміші води з 0,1 %-ною мурашиною кислотою.

28 Лікарський засіб, який відрізняється тим, що діючим началом виступає суміш І, одержана згідно з п 1, або суміш ІІ, одержана згідно з п 15, або оксамат натрію, або одна або декілька сполук формули



в якій R_1 являє собою атом водню, а R_2 являє собою ланцюг формули

$-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ (A) або

$-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ (B),

де R_1 являє собою ланцюг формули (A), а R_2 - атом водню та один або декілька наповнювачів

29 Лікарський засіб за п. 28, що містить один або кілька наповнювачів та сполуку, який відрізняється тим, що діюче начало являє собою суміш I, одержану згідно з п. 1, або суміш II,

Даний винахід стосується сумішей, ізольованих з насіння Євгенія Ямболана Ламарк (*Eugenia Jambolana* Lamarck) (родина миртових), лікарських засобів із вмістом цих сумішей або певних компонентів останніх, використання цих сумішей та їх компонентів для виготовлення протидіабетичного лікарського засобу та способу їх виготовлення

Рослинний екстракт, виготовлений з насіння або кори Євгенія Ямболана Ламарк із вмістом змішаного поліфенольного та стерольного комплексу, описаний в патенті FR 2465484

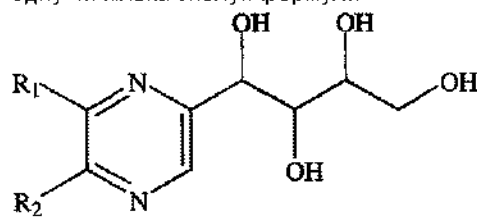
В наш час виявлені нові суміші, що виділяють з насіння Євгенія Ямболана Ламарк, що не містять поліфенольний та стерольний комплекс, а також деякі компоненти цих сумішей, що володіють цукрознижуючими властивостями

Ці суміші відрізняються тим, що вони не містять поліфенольних та стерольних похідних та виділяються шляхом подрібнення зерен Євгенія Ямболана Ламарк, мацерації порошку нижчим аліфатичним спиртом у гарячому стані, фільтрації, виділення нерозчинного осаду, що не містить поліфенольні та стерольні сполуки, обробки нерозчинного осаду аміачним розчином, обробки аміачної суміші нижчим аліфатичним спиртом у гарячому стані, фільтрації, виділення нерозчинного осаду та сушка цього осаду, що представляє собою суміш I, потім можливою обробкою суміші I розчином води з нижчим аліфатичним спиртом, фільтрації, часткового згущення фільтрата, очистки неполярними адсорбуючими смолами, часткового згущення фільтрату, очистки неполярними адсорбуючими смолами, часткового згущення, центрифугування, ультрафільтрації та виділення суміші II,

З суміші II можуть бути виділені оксамат натрію та компоненти формули

60299

6
одержану згідно з п. 15, або оксамат натрію, або одну чи кілька сполук формули

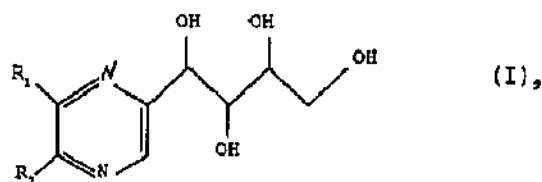


в якій або R_1 являє собою атом водню, та R_2 являє собою ланцюг формули

$-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ (A) або

$-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ (B),

або R_1 являє собою ланцюг формули (A), а R_2 являє собою атом водню, який застосовують для профілактики і лікування діабету та його ускладнень



де R_1 відповідає атому водню, а R_2 - ланцюгу формули

$-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ /A/,

$-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ /B/

або R_1 відповідає ланцюгу формули /A/, а R_2 - атому водню. Оксамат натрію вже описано Toussaint, Aim, 120,237 (1881). Сполуки формули (I) вже описані Kuhn et coll, ANN, 644,122-127 (1961), Tsuchida et coll, Agr Biol Chem, 39 (5), 1143-1148 (1975), Tsuchida et coll, Agr Biol chem, 40 (5), 921-925 (1976), Tsuchida et coll, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 37,154-161 (1990) Avalos et coll, tetrahedron, 49, 2655-2675 (1993)

Даний винахід відноситься також до способу приготування суміші I з насіння Євгенія Ямболана Ламарк, що були висушені та ретельно подрібнені

Порошок просіюється переважно за допомогою стандартного сита з отворами діаметром 0,5мм, а потім піддається наступній обробці

а) мацерації з розмішуванням в нижчому аліфатичному спирті при температурі в інтервалі 40-70°C,

б) фільтрації під вакуумом та виділенню нерозчинного осаду,

в) мацерації з розмішуванням, нерозчинного осаду в нижчому аліфатичному спирті при температурі в інтервалі 40-70°C,

г) фільтрації під вакуумом та видапінню спиртових фаз, що містять головним чином небажані поліфеноли та стероли,

д) обробці нерозчинного осаду в аміачному розчині при температурі в інтервалі 10-30°C,

е) обробці всієї вологої аміачної маси у розчині води з нижчим аліфатичним спиртом при температурі в інтервалі 40-70°C,

ж) фільтрації та виділенню спиртового

розчину,

з) промивці нерозчинного осаду нижчим аліфатичним спиртом, фільтрації та видаленню спиртового розчину,

й) виділенню нерозчинного осаду та просушці

На стадії а) обробка проводиться, як правило, за допомогою 2-10 літрів

нижчого аліфатичного спирту, наприклад, метанолу або етанолу, на 1 кг просіяного порошку. Переважно використовуються 5 літрів етанолу міцністю 93-95° по Гей-Люсаку при 60° С на протязі 1 години

Фільтрація на стадії г) здійснюється переважно під вакуумом 40кПа

На стадії в) на 1 кг вихідного просіяного порошку використовується звичайно від 2 до 10 літрів нижчого аліфатичного спирту, наприклад, метанолу або етанолу. Переважно використовується 4 літри етанолу міцністю 93-95° по Гей-Люсаку при температурі 60°С на протязі 1 години

Фільтрація на стадії г) здійснюється переважно під вакуумом 40кПа

На стадії д) на 1 кг вихідного просіяного порошку використовується звичайно 750-1250мл водного аміачного розчину з вмістом переважно 350мл 28%-го підрату окису амонію на 1000мл. Особливо переважно використовувати 1 літр водного аміачного розчину та діяти на протязі 10-30 годин, переважно 20 годин, при температурі приблизно 20°С

На стадії е) волога аміачна маса, отримана з 1 кг вихідного просіяного порошку, як правило, обробляється при розмішуванні в 2-10 літрах суміші нижчого аліфатичного спирту з водою (наприклад, метанолу або етанолу) (від 70/30 до 80/20 за об'ємом) найбільш переважно у 5 літрах суміші етанолу з водою (75/25 за об'ємом) при температурі 60°С на протязі 1 години

На стадії ж) фільтрація здійснюється переважно через бавовняну тканину під вакуумом приблизно 80кПа

На стадії з) промивка здійснюється, ж правило, з використанням 500-1500мл нижчого аліфатичного спирту (наприклад, метанолу або етанолу) 1 кг вихідного просіяного порошку, переважно 1 літру етанолу, а фільтрація здійснюється через бавовняну тканину під вакуумом приблизно 80кПа

На стадії і) сушка здійснюється переважно на відкритому повітрі, у тіні

Даний винахід відноситься також до способу приготування суміші ІІ

Отримана раніше суміш І піддається наступним операціям

к) обробка суміші І розчином води з нижчим аліфатичним спиртом,

л) відстаювання, а потім відкачка верхньої фази, яка фільтрується, утворюючи фільтрат 1, та обробка нижньої фази водою та фільтрація з утворенням фільтрату 2, об'єднання фільтратів 1 та 2 та концентрація у водній фазі,

м) обробка неполярною адсорбуючою смолою та фільтрація,

н) згущення фільтрата, фільтрація та ультрафільтрація,

о) ліофілізація та ізоляція екстракту ІІ

На стадії к) використовується звичайно від 10 до 25 літрів водного розчину нижчого аліфатичного спирту (наприклад, метанолу або етанолу) (у межах від 95/5 до 90/10 за об'ємом) на 1 кг суміші І. Переважно використовувати 18 літрів розчину вода-етанол (17,7-0,93 за об'ємом)

На стадії л) переважно фільтрувати верхню фазу через міткаль. Доцільно додати на 1 кг суміші від 10 до 25 літрів води в нижню фазу, більш переважно додати 10 літрів, та фільтрувати через фіртту

На стадії л) концентрування (згущення) звичайно здійснюється в термосифонному концентраторі при 35°С під вакуумом 0,4кПа

На стадії м) використовується переважно смола S861 або смоли типу XAD фірми Rhom та Hass, і фільтрація здійснюється через фіртту

На стадії н) концентрування здійснюється звичайно в термосифонному концентраторі при 35°С під вакуумом 0,4кПа. Також доцільно проводити послідовно 3 ультрафільтрації через патронний фільтр 10кДа, 3кДа та 1кДа. Даний винахід відноситься також до способу приготування оксамату натрію та компонентів формули ІІІ

Для цього суміш піддається наступним операціям

о) хроматографії суміші ІІ на колонці з кизельгуром, виділенню фракцій, що містять 4 продукта, та об'єднанню їх в одну фракцію

п) хроматографії раніше отриманої фракції на колонці з сефадексом для

отримання оксамату натрію, компонента формули ІІІ, що відрізняється тим, що R₁ відповідає атому водню, а R₂ - іншій частині ланцюгу /В/ та суміші компонента формули ІІІ, що відрізняється тим, що R₁ відповідає атому водню, а R₂ - іншій частині ланцюгу /А/, та компонента формули ІІІ, що відрізняється тим, що R₁ відповідає іншій частині /А/, а R₂ - атому водню,

р) можлива також ВЕЖХ - хроматографія суміші сполуки формули ІІІ, що відрізняється тим, що R₁ відповідає атому водню, а R₂ - іншій частині ланцюгу /А/ та сполуки формули ІІІ, що відрізняється тим, що R₁ відповідає іншій частині /А/, а R₂ - атому водню

Хроматографія на стадії о) здійснюється за допомогою органічного розчинника, наприклад, гептану, етилацетату або нижчого аліфатичного спирту. Переважно використовується колонка "CHEM ELUT" фірми Prolabo, насичена водою, а потім елюювана послідовно гептаном, сумішшю гептану з етилацетатом (50/50 за об'ємом), етилацетатом, сумішшю етилацетату з н-бутанолом (95/5, 90/10, 80/20, 50/50, 20/80), н-бутанолом з водою (98/2, а потім 95/5 за об'ємом)

Хроматографія на стадії п) здійснюється переважно за допомогою суміші етанол-вода (50/50 за об'ємом)

Хроматографія на стадії р) звичайно здійснюється на колонці YMC

180DS-AQ фірми АІТ з використанням в якості елюента суміші води з 0,1%-ою мурашиною кислотою

Нижчі аліфатичні спирти, що згадуються в

попередньому та послідовному описі, містять переважно від 1 до 4 атомів вуглецю

Предметом винаходу являються також лікарські засоби, що містять суміші I або II, або оксамат натрію, або один або декілька компонентів формули II

Даний винахід відноситься також до використання сумішей I і II, оксамату натрію та компонентів формули II або суміші останніх у виготовленні лікарських засобів для лікування або профілактики діабету та ускладнень, пов'язаних з діабетом

Винахід ілюструється наступними прикладами

Приклад 1. Приготування суміші I

Насіння ЕВГЕШЯ ЯМБОЛАНА ЛАМАРК сушиться на відкритому повітрі, у тіні, а потім добре подрібнюється. Отриманий таким чином порошок просіюється через сито с отворами 0,5мм. В 5 літрах етанолу міцністю 93-95° по Гей-Люсаку проводиться мацерація при механічному перемішуванні 1кг просіяного порошку на протязі 1 години та температурі 60°C. Після вакуум-фільтрації нерозчинний осад знову піддається мацерації в тих же умовах в 4 літрах етанолу вказаної міцності на протязі 1 години при 60°C. Обидва етанолових екстракта, що містять, головним чином, небажаний поліфенольний та стерольний комплекс, видаляються. Після повної фільтрації нерозчинний осад оброблюється в 1 літрі аміачного розчину (350мл 28%-ої NH_4OH та дистильована H_2O в достатній кількості для отримання 1 літра розчину) та залишається в розчині на протязі приблизно 20 годин при температурі біля 20°C. Волога аміачна маса піддається вторинній мацерації в 5 літрах суміші етанолу міцністю 93-95° по Гей-Люсаку з водою (75/25 за об'ємом) при механічному перемішуванні на протязі 1 години при 60°C. Осад фільтрується та промивається в 1 літрі етанолу вказаної міцності, фільтрат та промивочна рідина видаляються. Кінцевий нерозчинний осад сушиться на відкритому повітрі, в тіні. Таким чином, виходить суміш I в вигляді порошку, що не містить поліфенольні та стерольні похідні. Вихід із подрібненого та просіяного насіння складає 80%

Приклад 2. Приготування суміші II

Отриманий у попередньому прикладі 1кг суміші I перемішується на протязі 3 годин в розчині, що містить 17,7 літра води та 0,93 літра етанолу. Після відстаювання на протязі ночі верхня фаза відкачується (13,5 літра), а потім фільтрується через м'якль у фільтрі на 7 літрів (Schott), утворюючи фільтрат 1 (13,5 літра), а нижня фаза перемішується на протязі 1 години у 20 літрах води та фільтрується через фіртту №3, утворюючи фільтрат 2 (24 літра). Фільтрати 1 та 2 об'єднуються, а потім концентруються у водній фазі (33,5 літра) в термосифонному концентраторі (Schott) при 35°C під вакуумом 0,4кПа. Концентрат перемішується на протязі 1 години з 2,5 літрами смоли S861 (Rhon та Nass), а потім фільтрується через фіртту №3. Фільтрат концентрується в термосифонному концентраторі (Schott) при 35°C під вакуумом 0,4кПа на 5,5 літра. Концентрат піддається центрифугуванню в трубчатій центрифугі (центробіжна сила 62000g)

та фільтрується через фільтр 0,22мм (Gelman type supracap 100) насосом. Після 3 послідовних ультрафільтрацій через патронний фільтр 10Кд, 3Кд та 1Кд та ліофілізації виходить 25г суміші II у вигляді темно-бурого гіроскопічного порошку

Приклад 3. Компоненти, отримані з суміші II

525мг суміші II, отримані у прикладі 2, в розчині 1,1мл фільтрованої води milli Q піддаються хроматографії на колонці $^{\text{R}}$ CHEM ELUT фірми PROLABO висотою 50см та діаметром 1см, насичені фільтрованою водою milli Q. Елюювання здійснюється гептаном у повертаючому градієнті концентрації в етилацетаті, потім в н-бутанолі, н-бутанолі/соляній кислоті та у воді (фракція 1 гептан, фракція 2 гептан/етилацетат (50/50), фракції 3-4 етилацетат, фракції 5-6 етилацетат/н-бутанол (95/5), фракції 7-8 етилацетат/н-бутанол (90/10), фракції 9-10 етилацетат/н-бутанол (80/20), фракції 11-12 етилацетат/н-бутанол (50/50), фракції 13-14 етилацетат/н-бутанол (20/80), фракції 15-16 н-бутанол, фракції 17-18 н-бутанол/вода (98/2), фракції 19-21 н-бутанол/вода (95/5). Збираються фракції 50 мл. Фракції 19-21 об'єднуються і концентруються досуха під зниженим тиском. Таким чином виходить 108мг фракції, яка хроматографується на колонці з сефадексом LH20 фірми Pharmacia (висота 100см, діаметр 1см) сумішшю метанол/вода (50/50 за об'ємом). Елюювання здійснюється тією же елююючою сумішшю, збираються фракції 1мл

1, збираються та концентруються досуха фракції 88-91. Виходить 14,4мг продукту, який в результаті кристалізації в 0,5мл етанолу 2мг 2,5-ди-(тетрагідроксибутил)піразина утворює білі кристали, що відрізняються наступними показниками

- обертаюча здатність $[\alpha]_D^{20}$ (Na 589) = $-137 \pm 2,0$ (диметилсульфоксид, c=0,5),

- ІЧ-спектр, отриманий на приладі Nicolet 60SX-R в розчині в КВг, основні характеристичні смуги поглинання 3281cm^{-1} (ν OH зв'язані, втому числі H_2O),

$2972+2940+2901+2880\text{cm}^{-1}$ (ν CH груп CH, та CHOH), 2733cm^{-1} (ν зв'язані OH), 1635cm^{-1} (деформації OH, в тому числі H_2O), 1491cm^{-1} (ν C=C та C=N ядра піразина), 1449cm^{-1} (ν C=C і C=N ядра піразина + деформації OH), 1413cm^{-1} (деформації групи OH), 1343cm^{-1} (ν C=C та C=N ядра піразина), $1309+1290+1251+1215+1181+1161+1123\text{cm}^{-1}$ (деформації OH), 1092cm^{-1} (ν CO вторинних спиртів), $1048+1035\text{cm}^{-1}$ (ν CO первинних спиртів + ядро піразина), $947+899+854\text{cm}^{-1}$ (вторинні спирти), 877cm^{-1} (ν CN ядра піразина), 727cm^{-1} (ν ядро піразина + деформації OH), 639cm^{-1} (ядро піразина), $607+531\text{cm}^{-1}$ широкі (деформації OH), $451+411\text{cm}^{-1}$ (ядро піразина),

- мас-спектр, отриманий на приладі Фінган TSQ46, спосіб іонізації $M/z=321(\text{MH})^+$,

- ЯМР-спектр ^1H (800МГц, DMSO, хімічний зсув в ppm) 3,40 та 3,61 (2mts, 2H кожний CH_2 в 4', 4''), 3,58 (2mts, 2H кожний CH в 2', 2', 3', 3''), 4,36 (t широти, 2H OH в 4', 4''), 4,40 (d, J=7,2Гц, 2H OH в 2', 2''), 4,63 (d, J=4,8Гц, 2H OH в 3', 3''), 4,95 (dd, J=6,0 та 0,6Гц, 2H CH в 1', 1''), 5,30 (d, J=6,0Гц, 2H OH в 1', 1''), 8,61 (s, 2H, CH в 3 та 6),

- УФ-спектр $\lambda_{\text{макс}}=275\text{нм}$ ($\epsilon=8260$), 206нм ($\epsilon=10220$), ($c=19\text{мг/мл}$, вода $\lambda_{\text{макс}}=276\text{нм}$ ($\epsilon=7960$) 206нм ($\epsilon=9920$), ($c=19\text{мг/мл}$, $\text{HCl } 0,1\text{N}$), макс - 275нм ($\epsilon=7690$), ($c=19\text{мг/мл}$, $\text{KOH } 0,1\text{N}$),

- ВЕЖХ на колонці YMC 180 DS-AQ $150\times 4,6\text{мм}$ (партія AIT/DE940377) фірми AIT, ізократичне елюювання $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ мурашиної кислоти, витрати 1мл/хв , УФ-детектування на 270нм , час утримання $2\text{хв } 32\text{с}$

2 Фракція 92 і 93 збираються та концентруються досуха. Виходить 9мг фракції, яка в результаті кристалізації в $0,5\text{мл}$ етанолу дає $1,2\text{мг}$ оксамата натрія, що мають ті ж показники, що і описані TOUSSAINT, Ann., 120, 237 (1861)

3 Фракція з 94 і 97 збираються та концентруються досуха. Виходить $25,9\text{мг}$ фракції, яка після кристалізації в $0,5\text{мл}$ етанолу дає $6,2\text{мг}$ суміші 2-(тетрагідроксибутил)-5-(2',3',4'-

тригідроксибутил)піразина та 2-(тетрагідроксибутил)-6-(2',3',4'-

тригідроксибутил)піразина, який знову відділяється ВЕЖХ на колонці YMC 180DS-AQ $150\times 4,6\text{мм}$ (партія AIT/DE940377), ізократичне елюювання $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ мурашиної кислоти, витрати 1мл/хв , УФ-детектування на 270нм

Таким чином, виходять $5,2\text{мг}$ 2-(тетрагідроксибутил)-5-(2',3',4'-тригідроксибутил)піразина, який відрізняється наступними показниками

- обертаюча здатність $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ ($\text{Na } 589$) = $-116,3^{\circ}\pm 1,7$ (диметилсульфоксид,

- ІЧ-спектр, отриманий на приладі Nicolet 80SX-R в розчині KBr, основні характеристичні смуги поглинання 3398см^{-1} (ν OH зв'язані, в тому числі H_2O), $2951+2922+2891\text{см}^{-1}$ (ν CH групи CHOH), 2761см^{-1} (ν OH зв'язані), 1636см^{-1} (деформації OH, в тому числі H_2O), $1483+1463\text{см}^{-1}$ (ν C=C та C-N ядра піразина), 411см^{-1} (деформації груп OH), $1367+1328+1270+1227+1191\text{см}^{-1}$ (деформації груп OH), 1071см^{-1} (ν CO вторинних спиртів), 1041см^{-1} (ν CO первинних спиртів + ядро піразина), $943+897\text{см}^{-1}$ (вторинні спирти), 869см^{-1} (ν CH ядра піразина), 645см^{-1} (CH ядра піразина), 607см^{-1} широкі (деформації OH), $446+409\text{см}^{-1}$ (ядро піразина),

- мас-спектр, отриманий на приладі Фінган TSQ46, спосіб іонізації $\text{M/z}=305$ (MH)+,

- ЯМР-спектр ^1H (600МГц , DMSO, хімічний зсув в ppm) $2,70$ і $3,04$ (2dd, $J=9,0$ і $15,0\text{Гц}$ і $J=3,0$ і $15,0\text{Гц}$, 1H кожний CH_2 в $1''$), між $3,30$ та $3,45$ (mts, CH в $3'',4',4''$), між $3,53$ та $3,65$ (mts, 4H CH в $2',3',4',4''$), $3,73$ (mts, 1H CH в $2''$), $4,37$ (t ширини, 1H OH в $4'$), $4,42$ (mts, 2H OH в $2'$ та $4''$), $4,60$ (d, $J=6\text{Гц}$, 1H OH в $2''$), $4,63$ (d, $J=6\text{Гц}$, 1H OH в $3'$), $4,67$ (d, $J=6\text{Гц}$, 1H OH в $3''$), $4,92$ (dd, $J=6,0$ і $0,6\text{Гц}$, 1H CH в Γ), $5,30$ (d, $J=6,0\text{Гц}$, 1H OH в Γ), $8,39$ (s, 1H , CH в δ), $8,61$ (S, 1H , CH в 3),

- УФ-спектру $\lambda_{\text{макс}}=276\text{нм}$ ($\epsilon=7756$), 206нм ($\epsilon=8738$), ($c=19\text{мг/мл}$,

вода), $\lambda_{\text{макс}}=277\text{нм}$ ($\epsilon=7218$), 208нм ($\epsilon=7171$), ($c=19\text{мг/мл}$, $\text{HCl } 0,1\text{N}$), $\lambda_{\text{макс}}=276\text{нм}$ ($\epsilon=7467$) ($c=19\text{мг/мл}$, $\text{KOH } 0,1\text{N}$),

- ВЕЖХ на колонці YMC 180 DS-AQ $150\times 4,6\text{мм}$ (партія AIT/DE940377) фірми AIT, ізократичне елюювання $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ мурашиної

кислоти. Витрати 1мл/хв , УФ-детектування на 270нм , час витримання $3\text{хв } 75\text{с}$ та 1мг 2-(тетрагідроксибутил)-6-(2,3,4-тригідроксибутил)піразина, який відрізняється наступними показниками

- ЯМР-спектр ^1H (600МГц , DMSO, хімічний зсув в ppm) $2,70$ та $3,04$ (2dd, $J=9,0$ та $15,0\text{Гц}$ та $J=3,0$ та $15,0\text{Гц}$, 1H кожний CH_2 в $1''$), між $3,30$ та $3,45$ (mts, CH в $3'',4',4''$), між $3,53$ та $3,65$ (mts, 4H CH в $2',3',4',4''$), $3,73$ (mts, 1H CH в $2''$), $4,37$ (t ширини, 1H OH в $4'$), $4,42$ (mts, 2H OH в $2'$ та $4''$), $4,60$ (d, $J=6\text{Гц}$, 1H OH в $2''$), $4,63$ (d, $J=6\text{Гц}$, 1H OH в $3'$), $4,67$ (d, $J=6\text{Гц}$, 1H OH в $3''$), $4,92$ (dd, $J=6,0\text{Гц}$ і $0,6\text{Гц}$, 1H CH в Γ), $5,30$ (d, $J=6,0\text{Гц}$, 1H OH в Γ), $8,31$ (s, 1H , CH в δ), $8,53$ (S, 1H , CH в 3),

- ВЕЖХ на колонці YMC 180 DS-AQ $150\times 4,6\text{мм}$ (партія AIT/DE940377) фірми AIT, ізократичне елюювання $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ мурашиної кислоти, витрати 1мл/хв , УФ-детектування при 270нм , час утримання $3\text{хв } 61\text{с}$

Цукропонижуючий ефект сумішей I та II, оксамата натрія і компонентів формули II визначали на мишах, у яких діабет викликали введенням стрептозоцину, та на нормальних мишах у стані післяобідньої гіперглікемії у відповідності з наступною процедурою

I Миші, у яких діабет викликали введенням стрептозоцину. У білих мишей Swiss вагою $22-25\text{г}$ діабет викликали шляхом внутрішньочеревинного введення стрептозоцину в дозу 210 або 265мг/кг ваги миші, розведеного в цитратному буфері, в концентрації, що дозволяє кожній миші отримати $0,2\text{мл}$ розчину у день 1-й (Д1). Після 3-4 днів на 2-3 мишах було перевірено наявність діабета (глікемія вище $7,2\text{ммоль/лтр}$, тобто 130мг на 100мл). Потім глікемія була вимірена по закінченню 4 годин після прийому їжі. Якщо миші стали діабетичними, їх ділять на групи по 5-7 мишей. Кожна група, починаючи з Д1, отримує кожен день певну дозу продукту. Прийом здійснюється один раз в день в певний час шляхом інтубації шлунку та супроводжується наповнювачем $0,4\text{мл}$ дистильованої води. Утворюються дві контрольні групи

- група мишей з діабетом, не охоплена курсом лікування,

- тупа нормальних мишей

Обидві контрольні групи отримують шляхом інтубації шлунку одночасно з мишами, що включені в курс лікування, по $0,4\text{мл}$ наповнювача

Лікування продовжується 4 дні. На 5-й день продукт не приймається. По закінченню 4 годин після прийому їжі проводиться замір кінцевого рівня глікемії

II Нормальні миші у стані післяобідньої гіперглікемії

Білі миші Swiss вагою $22-25\text{г}$ приводяться в стан післяобідньої гіперглікемії у відповідності із наступною процедурою

- утримання від прийому їжі на протязі 2 годин,

- надмірне харчування на протязі 1 години,

- утримання від прийому їжі на протязі 2 годин

По закінченню 2 останніх годин утримання проводиться замір рівню глікемії, що складає глікемію на час T_0 . Вслід за цим миші діляться на однакові групи в залежності від рівню глікемії при

замірі. Опробований продукт вводиться відразу ж шляхом інтубації шлунку разом з 0,4мл дистильованої води. Контрольна група отримує

наповнювач (0,4мл дистильованої води). По закінченню 1 години проводиться замір кінцевого рівню глікемії, яка вважається глікемією на час T_{60} .

Показники глікемії мишей, що захворіли діабетом в
результаті введення стрептозотоцину

ПРОДУКТИ, мг/мивш/день	КІЛ-ТЬ МИШЕЙ	ГЛІКЕМІЯ НА Д1, мг/100мл	ГЛІКЕМІЯ НА Д5, мг/100мл	%ІНГІ- БУВА- ННЯ
Оксамат натрію (0,5 мг)	5	153,40±11,53	89,90±13,94	-41,46
Сумиш II (0,5мг)	5	270,50±58,72	117,50±17,35	-56,56
2-(тетрагідро- ксибутил)-5-(2',3,4'- тригідроксибутил) празин (0,5мг) 2-	5	304,25±99,35	164,50±95,13	-45,93
(тетрагідро- ксибутил)-5-(2',3',4'- тригідроксибутил) празин 1- 2-	6	320,83±130,30	174,00±97,74	-45,77
(тетрагідрокси- бутил)-6-(2',3',4'- тригідроксибутил) празин (50 50) (0,25мг)	5	221,66±50,17	210,33±20,07	-5,11
Контрольна група	5			

Показники глікемії контрольних мишей у стані післяобідньої гіперглікемії

Показники глікемії контрольних мишей у стані

післяобідньої гіперглікемії				
ПРОДУКТИ, мг/мивш/день	КІЛ-СТЬ МИШЕЙ	ГЛІКЕМІЯ НА T_{00} мг/100мл	ГЛІКЕМІЯ НА T_{60} мг/100мл	%ІНГІ- БУВА- ННЯ
Сумиш I(5мг)	5	129,50±29,06	87,60±14,16	-32,35
Оксамат натрію (0,5 мг)	15	136,46±23,69	102,93±20,95	-24,57
Сумиш II(0,5мг)	15	133,93±17,50	105,60±16,91	-21,15
2,5-лм(тетра- гідроксибу- тил) празин	10	136,25±16,92	102,41±14,12	-24,83
(0,5мг)2'-(тетра- гідроксибутил)- 5-(2',3',4'- тригідрокси- бутил) празин (0 5мг)	10	128,75±21,23	90,50±19,55	-29,70
2-(тетрагідро- ксибутил)-5- (2',3',4'-три- гідроксибутил) празин 1 2-	5	126,50±17,03	100,60±16,88	-20,53
(тетрагідрокси- бутил)-6-(2',3',4'-три- гідроксибутил) празин(50 50) (0,25мг)	10	137,83±13,99	130,50±20,23	-5,32
Контрольна група	10			

Суміші, у відповідності з винаходом, оксамат натрію та компоненти формули (I) володіють легкою токсичністю, їх DL50 перебільшує 2000мг/кг при пероральному введенні у мишей

Суміші, у відповідності з винаходом, оксамат натрію та компоненти формули (I) знижують глікемію страждаючого діабетом і, таким чином, корисні для лікування діабету та ускладнень, пов'язаних з діабетом

При використанні цих продуктів в монотерапії для лікування діабету не виникає ризику гіпоглікемії. Це дійсні протидіабетичні засоби. Мабуть, цей ефект є результатом периферичного збільшення глюкози. Продукти не стимулюють значне виділення інсуліну, але для їх дії необхідно невелика кількість інсуліну

У піщаної криси (*Psammomys obesus*), яка у неволі самовільно піддається діабету, ці продукти знижують гіперглікемію, попереджують або зменшують виникнення катаракти та збільшують у певному ступені плодовитість

При лікуванні людини ці продукти також корисні у профілактиці та лікуванні діабету та, зокрема, діабета II типу (MD діабет) без ацетонурії, діабета з ожирінням, діабета п'ятидесятилітніх, діабета метаболічного, діабета дорослих та діабета у легких формах. Вони можуть бути використані у доповнення інсулінотерапії (через їх потенціюючи інсуліноактивність) при інсулінозалежному діабеті, коли вони дозволяють поступово зменшувати дозу інсуліну, при нестійкому діабеті, інсулінорезистентному діабеті, в доповненні гіпоглікемізуючим сульфамідам, коли останні не визначають значного зниження глікемії. Ці продукти можуть також бути використані при ускладненнях, пов'язаних з діабетом, наприклад, при гіперліпеміях, порушеннях ліпідного обміну, дізліпеміях, ожирінні. Рівним чином, вони корисні в профілактиці та лікуванні уражень атеросклерозом та їх ускладнень (коронаропатій, інфарктів міокарді, кардіоміопатій, еволюції цих трьох ускладнень у напряму лівошлункової недостатності, різних артеріопатій, артерітів нижчих кінцівок з появою кульгавості та розвитком виразки та гангрени, цереброваскулярної недостатності та її ускладнень, статевої імпотенції судинного походження), діабетичної ринопатії та всіх її проявів (підвищення проникливості капілярів, розширення та тромбоз капілярів, мікроаневризми, артеріовенозний шунт, точечні та макулярні кровотечі, ексудати, макулярні набряки, прояв проліферуючої ретинопатії неосудний, рубці проліферуючого ретиніту, крововиливи в очне тільце, відшарування сітчатки), діабетичної катаракти, діабетичної невропатії в її різних формах (периферичні поліневропатії та їх прояв, наприклад, парестезії, гіперестезії та болі, мононевропатії, радікулопатії, автономні невропатії, аміотрофії діабетичні), проявів діабетичної стопи (виразки нижніх кінцівок та стопи), діабетичної нефропатії в двох її формах: дифузій та вузловатій, атероматоза) збільшення ліпопротеїнів високої щільності -ЛПВ, що сприяють

елімінації холестерину, починаючи з атероматозних бляшок, зменшення ліпопротеїнів низької щільності -ЛНП, зниження співвідношення ЛНП/ЛВП, інгібування окислення ЛНП, зменшення адгезивності тромбоцитів), гіперліпемій та дизліпемій (гіперхолестеринемій, гіпертригліцеридемій, нормалізація вмісту жирних кислот, нормалізація урикемії, нормалізація апопротеїнів А та В), катаракти, гіпертонії та її наслідків

Лікарські засоби відповідно винаходу складаються із суміші, що відповідає винаходу, оксамату натрію, сполуки формули (I) або комбінації цих продуктів, у чистому виді або у композиції, в якій вона асоціюється з будь-яким іншим фармацевтичним сумісним продуктом, який може бути інертним або фізіологічне активним. Лікарські засоби у відповідності з винаходом можуть вводитися перорально, парентерально, ректально або мати поверхневе застосування

У вигляді твердих композицій для перорального введення можуть застосовуватися таблетки, пілюлі, порошки (желатинові капсули, облатки) або гранули. В цих композиціях діючий початок у відповідності з винаходом змішуються з одним або декількома інертними розчинниками, наприклад, крохмалом, целюлозою, сахарозою, лактозою або діоксидом кремнію, у тоці аргону. Ці композиції також можуть включати, окрім розчинників, інші речовини, наприклад, одна або декілька зв'язуючих речовин, таких як стеарат магнію або тальк, барвник, сироп (дкраже) або лак

У вигляді рідких композицій для перорального введення можуть застосовуватися розчини, суспензії, емульсії, сиропи, еліксири, фармацевтичне прийнятні та ті, що містять інертні розчинники, наприклад, вода, етанол, гліцерин, олія або парафінове масло. Ці композиції, крім розчинників, можуть також включати інші речовини, наприклад, змочувачі речовини, підслащувачі, загусники, ароматизатори або стабілізатори

Стерильні композиції для парентерального введення можуть бути переважно водними або неводними розчинами, суспензіями або емульсіями. В якості розчинника або наповнювача можуть використовуватися вода, поліетиленгліколь, поліетиленгліколь, олія, зокрема, оливкове масло, вприскувані органічні ефіри, наприклад, етилопепат, або інші прийнятні органічні розчинники. Ці композиції можуть також містити добавки, зокрема, змочувачі речовини, ізотонуючі, емульгуючі, диспергуючі, та стабілізуючі. Стерилізація може проводитися різними способами, наприклад, асептичним фільтруванням шляхом включення в композиції стерилізуючих засобів, опроміненням або нагрівом. Вони можуть бути також виготовлені у вигляді твердих стерильних композицій, які можуть бути розчинені в момент виготовлення в стерильній воді або у іншій вприскуваній стерильній рідині

Композиції для ректального ведення - це свічі або ректальні капсули, що містять, крім діючої речовини, наповнювачі типу масло какао,

напівсинтетичні гліцериди або поліетиленгліколи

Композиціями місцевого внутрішнього застосування можуть бути, наприклад, креми, пошйони, очні краплі, краплі в ніс, рідина для полоскання, аерозолі

Дозування залежить від ефекту, що передбачається, довготривалості лікування та способу введення, що використовується, звичайно добова доза перорально для дорослого складає 150-600мг, а разові дози від 50 до 200мг діючої речовини

Як правило, лікар визначає необхідне дозування в залежності від віку, ваги та інших факторів, що характеризують пацієнта

Слідуючі приклади ілюструють композиції відповідно винаходу

ПРИКЛАД А

По відомій технології виготовляються желатинові капсули в дозі по 50мг діючої речовини

- Діюча речовина	50мг
- Целюлоза	18мг
- Лактоза	55мг
- Колоїдний диоксид кремнію	1мг
- Натрієва сіль карбоксиметилкрохмалю	10мг
- Тальк	10мг
- Стеарат магнію	1мг

ПРИКЛАД В

По відомій технології виготовляються таблетки у дозі по 50мг діючої речовини

Діюча речовина	50мг
Лактоза	104мг
Целюлоза	40мг
Полівідон	10мг
Натрієва сіль карбоксиметилкрохмалю	22мг
Тальк	10мг
Стеарат магнію	2мг
Колоїдний диоксид кремнію	2мг
Суміш оксиметилцелюлози, гліцерину, окису титана (72 3,5 24,5)	
в достатній кількості для 1 таблетки в оболонці на	245мг

ПРИКЛАД С

Виготовлюється розчин для ін'єкцій, що містить 50мг діючої речовини,

Діюча речовина	50мг
Бензойна кислота	80мг
Бензиловий спирт	0,08мл
Натрійбензоат	80мг
95%-ий етанол	0,4мл
Гідроксид натрію	24мг
Пропіленгліколь	1,6мл
Вода (в достатній кількості)	4мл