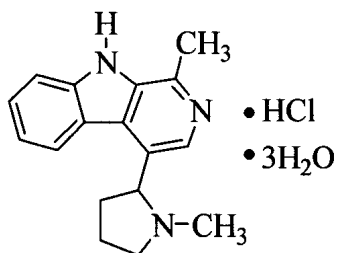


Invenția se referă la industria farmaceutică, în particular la obținerea brevicolinei-bază din *Carex brevicollis* D.C. *Carex brevicollis* D.C. este o plantă cu conținut înalt de alcaloizi, vast răspândită în Moldova. Alcaloizii pe care îi conține partea ierboasă a *Carex brevicollis* D.C. (CB) fac parte din grupul alcaloizilor indolici, în structura cărora sistemul β -carbolinic este conjugat cu ciclul pirodindinic precum în structura brevicolinei.

Brevicolina-bază reprezintă materia primă pentru obținerea preparatului farmaceutic „Brevicolin” – o soluție de hidrociorură a brevicolinei-bază, cu următoarea formulă structurală:



Ațiunea farmacologică a preparatului se manifestă atât prin creșterea tonusului și a forței contracțiilor uterine, cât și prin acțiune ganglioblocantă. Remediu dat se recomandă pentru utilizare în practica obstetrică pentru stimularea nașterii în caz de insuficiență a contracțiilor expulzive și la scurgerea prematură a lichidului amniotic.

În producerea preparatului de brevicolină principala etapă tehnologică este obținerea brevicolinei-bază din materia primă vegetală de *Carex brevicollis* D.C. [1].

Cea mai apropiată soluție de invenția revendicată după totalitatea de caracteristici este metoda de obținere a hidrociorurii de brevicolină, în care, în calitate de etapă intermediară, este descris procesul de obținere a brevicolinei-bază (BB) [2].

Pentru obținerea BB după metoda cunoscută în baloane cu materia primă vegetală mărunțită de CB se adaugă soluție de H₂SO₄ 2%.

Amestecul se menține la temperatură constantă între 40...60°C timp de 3 ore. După aceasta, faza lichidă din primul balon se toarnă în al doilea și, dacă este necesar, se adaugă soluție de H₂SO₄. Amestecul format se lasă timp de 3 ore în aceleași condiții, după care faza lichidă se toarnă în al treilea balon și operația se repetă. Procesul descris de extragere în contracurent este greu de realizat din punct de vedere tehnologic în absența echipamentului special.

Extractele acide obținute sunt neutralizate până la pH 8...9. Soluțiile alcaline sunt supuse extracției cu CHCl₃. După separarea straturilor, fiecare dintre acestea se scurge prin sifonare. Din stratul de cloroform alcaloizii trec iarăși în soluția de acid sulfuric din care BB se precipită la adăugarea soluției concentrate de NH₄OH până la pH 9. Precipitatul format se separă, se spală și se usucă. Din reziduu uscat se extrage BB prin fierberea multiplă în metanol, după care substanța se cristalizează la rece.

Dezavantajele principale ale metodei sunt: lipsa descrierii caracteristicilor masei vegetale: locul creșterii, timpul culegerii, umiditatea materiei prime uscate, gradul de mărunțire. Calitatea produsului final și randamentul lui depind de parametrii dați.

Problema pe care o soluționează invenția constă în obținerea din masă vegetală de *Carex brevicollis* D.C. cu caracteristici determinate a brevicolinei-bază cu un randament deplin.

Esența invenției constă în aceea că procedeul de obținere a brevicolinei-bază din *Carex brevicollis* D.C. include uscarea masei vegetale până la umiditatea de cel mult 5...7%; mărunțirea ulterioară a acesteia într-un concasor cu ciocane cu diametrul orificiilor de 5x25 mm; tratarea repetată a masei vegetale mărunțite cu soluție de acid sulfuric de 1% în raportul de 1:(8...9) corespunzător la temperatura de 80...85°C timp de 3...5 min și presiunea de 16·10³...20·10³ Pa, cu amestecare la presiune atmosferică. Extragerea s-a efectuat în 3 etape în regim staționar într-un sistem de extragere, format din cel puțin trei capacități de tip pânle unite consecutiv și amplasate vertical, cu o soluție de acid sulfuric de 1% la temperatura de 80...85°C timp de 24...48 ore cu evacuarea la fiecare etapă a 1/6 părți de volum de extract din ultima capacitate, înlocuirea cu aceeași parte de volum de extract din capacitatea precedentă și adăugarea în prima capacitate a soluției de acid sulfuric; unirea extractelor; neutralizarea și alcalinizarea extractului acid până la pH 8...9 cu extragerea ulterioară cu solvenți organici în raport de cel puțin 4:1 respectiv cu agitarea intensă timp de 3...5 min. În continuare s-a efectuat concentrarea extractului până la reziduu uscat; tratarea acestuia cu acetonă în raport de 1:3 respectiv; fierberea suspensiei cu reflux la amestecare timp de 10...15 min; răcirea până la -5...0°C; filtrarea; spălarea cu acetonă rece și uscarea.

Masa vegetală mărunțită conține, în % mas.: o fracție cu diametrul particulelor de 0,5 mm – 36%, o fracție cu diametrul particulelor de 1,25 mm – 29%, o fracție cu diametrul particulelor de cel puțin 2,5 mm – 35%. Conform procedurii, în calitate de solvenți organici se utilizează diclormetan, dicloretan, cloroform.

În procedeul revendicat s-a utilizat rogozul cules în perioada mai-iunie 2010 într-un masiv forestier din raionul Ialoveni, Republica Moldova. Masa vegetală colectată a fost uscată într-o încăpere închisă și bine ventilată până la umiditatea reziduală maximă de 5...7%, apoi supusă mărunțirii cu ajutorul unui dispozitiv pentru tăierea paielor și măcinării unice într-un concasor cu ciocane cu diametrul orificiilor de 5x25 mm. Aceasta a permis de a obține masă vegetală mărunțită cu o fracție cu diametrul particulelor de 0,5 mm – 36%, o fracție cu diametrul particulelor de 1,25 mm – 29% și o fracție cu diametrul particulelor de 2,5 mm – 35%.

Masa vegetală de *Carex brevicollis* D.C în stare integrală și măcinată nu se îmbibă o perioadă îndelungată de timp, chiar după 3 ore în soluție de H_2SO_4 2% la temperatura de 50...60°C. Ca rezultat, ea plutește și are un grad scăzut de contact cu extragentul.

Cu scopul de a asigura umectarea integrală a masei vegetale, invenția propusă presupune prelucrarea ei multiplă cu soluție de H_2SO_4 1% sub vid.

Extragerea în 3 etape se realizează în regim staționar într-un sistem de extragere format din cel puțin trei capacități de tip pâlnie, unite consecutiv și amplasate vertical, cu o soluție de acid sulfuric. Partea îngustă a extractorului, mai aproape de deschidere, se umple cu pietriș sau granit mărunțit, formând „zona moartă”. Volumul de lucru constituie partea cilindrică a vasului cu diametrul de 160 mm și înălțimea de 180 mm. Într-un sac din pânză de bumbac plasat în volumul de lucru se transferă mecanic dintr-un excicator cu vid 300...400 g de CB tratată în prealabil sub vid cu soluție de H_2SO_4 1% încălzită până la 80...85°C, raportul de masă fiind 1:(8...9). La masa vegetală umectată transferată în pâlnia de extracție se mai adaugă soluție fierbinte de H_2SO_4 1% până la formarea unui strat superior mobil.

În figură este prezentat grafic sistemul de extragere.

Timpul macerării în cele trei capacități de tip pâlnie este de 24 ore.

Peste 24 ore se efectuează extracția semidinamică, care presupune scurgerea din capacitatea inferioară de tip pâlnie a 500 ml de extract, care este înlocuit cu 500 ml de extract din capacitatea de mijloc, în care ulterior se scurg 500 ml din capacitatea superioară. După aceasta, în capacitatea superioară se toarnă 500 ml de extragent fierbinte. Peste 10...15 min se repetă scurgerea conform schemei descrise mai sus. Astfel procesul se repetă periodic până la scurgerea totală din capacitatea inferioară a 6...6,5 l de extract I.

Ulterior masa vegetală se supune extracției cu extragent proaspăt timp de 24 ore. Scurgerea extractului al II-lea se efectuează după aceeași metodă. După obținerea extractului al II-lea, extragentul proaspăt adăugat poate fi lăsat, după necesitate, pentru cel mult 48 de ore.

Astfel se rezolvă una din sarcinile propuse de organizare a extracției eficiente a alcaloizilor și a simplificării procesului tehnologic, care poate fi considerat drept un model al tehnologiei industriale.

Al III-lea extract se obține în regimul scurgerii simultane succesive din toate cele trei capacități de extracție. De obicei se obțin 4...4,5 l de extract.

Dezavantajul principal celei mai apropiate soluții, este formarea precipitatului la prima neutralizare a extractului acid. Fără separarea acestuia este practic imposibilă extragerea alcaloidului cu $CHCl_3$, CH_2Cl_2 sau dicloretan, deoarece se formează cel puțin 2 straturi de emulsie stabilă care nu se separă în straturi după o decantare îndelungată. S-a depistat că, cantitatea de precipitat care se sedimentează la neutralizarea extractului acid depinde de cantitatea de H_2SO_4 în soluția de extragent. Cea mai mică cantitate de precipitat se formează la utilizarea soluției de H_2SO_4 1%, o cantitate mult mai mare de precipitat formându-se la utilizarea H_2SO_4 2% și 3%. Din aceste considerente s-a propus efectuarea extracției alcaloizilor din *Carex brevicollis* D.C. cu soluție de H_2SO_4 1%, ceea ce duce la formarea unei emulsii mai puțin stabile și permite economisirea reactivelor.

În cazul în care extracția se efectuează imediat după neutralizarea până la pH 8...9 se poate neglija cantitatea nesemnificativă de precipitat, iar pentru stabilitatea extractului se efectuează trecerea lui printr-un strat subțire de Al_2O_3 sub vid moderat.

Extracția acidă repetată cu soluție de H_2SO_4 5% a extractului din soluția alcalină, propusă în cea mai apropiată soluție, care la neutralizarea ei duce la formarea unui precipitat amorf greu separabil, poate fi exclusă pentru evitarea complicării procesului tehnologic.

Purificarea produsului țintă de produsele secundare se efectuează mai simplu din resturi formate la eliminarea totală a extragentului organic din extractul soluțiilor alcaline prin spălarea lor cu o cantitate minimă de acetonă. În cazul acesta, procesul tehnologic se simplifică, excluzându-se trei etape tehnologice, iar cantitatea de produs final este suficientă pentru obținerea preparatului farmaceutic, precum și pentru transformările sintetice ulterioare.

Exemplu de realizare a invenției

Pentru obținerea brevicolinei-bază se utilizează masă vegetală de *Carex brevicollis* D.C. colectată în mai-iunie 2010 din masivul forestier aflat în raionul Ialoveni, Republica Moldova. Masa vegetală colectată se usucă într-o încăpere închisă și bine ventilată până la umiditatea reziduală maximă de 5...7%, se supune mărunțirii cu ajutorul unui dispozitiv pentru tăierea paielor și apoi măcinării unice într-un concasor cu ciocane cu diametrul orificiilor de 5 x 25 mm. Ca rezultat, se obține masa vegetală mărunțită cu următoarele dimensiuni: o fracție cu diametrul particulelor de 0,5 mm – 36%, cu diametrul de 1,25 mm – 29% și o fracție cu diametrul particulelor de 2,5 mm și mai mult – 35%.

Pentru realizarea extracției în contracurent cu soluție de H_2SO_4 se utilizează trei capacități de tip pâlnie amplasate vertical cu diametrul volumului de lucru de 160 mm și înălțimea de 180 mm. „Zona moartă” (partea îngustă mai aproape de deschidere, care se termină cu un robinet) se umple cu pietriș sau granit mărunțit.

Înainte de procesul de extracție staționară se efectuează vidarea de 3-4 ori în mediul soluției de H_2SO_4 1%. În acest scop, 330 g de masă vegetală de CB se transferă într-un excicator sub vid, în care se adaugă la amestecare, în câteva porțiuni, soluție de H_2SO_4 1% încălzită la 80...85°C. Se creează un vid de $16 \cdot 10^3$... $20 \cdot 10^3$ Pa, care se menține timp de 3...5 min, apoi se trece la presiune atmosferică. Amestecul de masă vegetală cu soluția de H_2SO_4 1% se amestecă și vidarea se repetă. După aceasta, amestecul bine umectat și unit se transferă într-un sac din pânză de bumbac, plasat în partea cilindrică a pâlniei de extracție, și se adaugă 0,5 l soluție de H_2SO_4 1%.

Astfel, se încarcă toate trei capacități de extracție. Prima extracție se efectuează într-un regim static timp de 24 ore. Deplasarea primului extract se efectuează prin extracția în contracurent a alcaloizilor în regim semidinamic, care presupune următoarele etape.

Din capacitatea inferioară se evacuează 500 ml de extract, care se înlocuiește cu 500 ml de extract din capacitatea de mijloc, în care ulterior se adaugă 500 ml din pâlnia superioară.

În capacitatea superioară se toarnă 500 ml de soluție proaspătă de H_2SO_4 1% încălzită până la 80...85°C. Peste 10...15 min se repetă eliminarea conform schemei descrise mai sus. Primul extract se consideră eliminat când volumul total de extract din capacitatea inferioară constituie 6...6,5 l. După aceasta începe regimul static de extracție a alcaloizilor în extractul al II-lea, care decurge timp de 48 ore. Separarea extractului al II-lea se efectuează după metoda aplicată pentru extractul I.

După recuperarea extractului al II-lea masa vegetală de CB poate să se afle în contact cu soluția de H_2SO_4 1% timp de 24...48 ore. Separarea extractului al III-lea se efectuează concomitent din toate trei capacități de extracție, obținându-se 4...4,5 l de fază lichidă. Extractele acide pot fi păstrate cel mult 7...10 zile, până la neutralizarea și alcalinizarea extractului acid la pH 8...9 fără decantare intermediară supuse extracției cu solvenți organici (CH_2Cl_2 , $CHCl_3$, dicloretan ș. a.).

Procesul de extracție a alcaloizilor din soluții alcaline se efectuează în capacități separatoare cu agitarea intensă a porțiunilor fracționate ale fazelor timp de 3...5 min în raport cu soluția alcalină 4:1.

Dacă înaintea extracției cu solventul organic se separă un precipitat, soluția deasupra precipitatului se decantează, precipitatul se lasă pentru sedimentare, după care se filtrează printr-un strat dens de pânză de bumbac, întâi prin scurgere liberă, apoi sub presiune scăzută. Faza de extract organic reprezintă de obicei o emulsie stabilă, 2/3 din care după 2...3 ore de amestecare se separă. Stratul superior al emulsiei, fiind cel mai stabil, se separă la filtrarea lentă sub vid printr-un strat subțire (3...5 mm) de Al_2O_3 .

Extractul organic al alcaloizilor separat de faza apoasă se usucă cu $CaCl_2$ calcinat sau Na_2SO_4 anhidru și se concentrează prin distilarea extragentului. Separarea finală se efectuează cu acetonă rece până la formarea unui reziduu uscat sub vid pe baie de apă la fierbere.

Reziduu uscat, care reprezintă o substanță rășinoasă colorată, se diluează cu acetonă în raport de 1:3. Suspensia care se formează se fierbe cu reflux la amestecare timp de 10...15 min. Pentru separarea brevicolinei-bază suspensia se răcește până la temperatura de 0°C. Masa răcită se diluează dacă este necesar cu cantitatea minimă de acetonă rece și, sub formă de pastă, se trece pe un filtru, prin care, sub vid, se separă impuritățile dizolvate în acetonă. Brevicolina-bază se spală lent pe filtru cu porțiuni mici de acetonă rece. Precipitatul spălat se usucă la temperatura camerei. Brevicolina-bază reprezintă o pulbere de culoare crem-gălbui cu $T_t = 222...225^\circ C$. Randamentul constituie 0,3...0,4% de la masa materiei prime vegetale uscate la aer.

După o recristalizare dublă din CH_3OH și purificare cu cărbune activat s-a obținut o substanță cristalină albă cu o ușoară nuanță cafenie cu $T_t = 225...227^\circ C$ (CH_3OH), $[\alpha]_D - 154,16$ (CH_3OH), calculat, %: $C_{17}H_{19}N_3$ Mm – 265,4, %C – 77, H – 7,2, N – 15,8; determinat Mm = 269,9 (după Rast) [2], % C – 75; 79, H – 6,9; 7,0 N – 15,6; 16,0 $[\alpha]_D - 154,16$ (c 0,9 CH_3OH), spectrul UV (λ_{max} , nm): 245, 289, 334, 360. $R_f - 0,7$ în sistemul $CH_3OH - NH_4OH$ (10:0,03), Silufol.

Spectrul¹ H RMN (400,13 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm, J/Hz): 1,87–2,11 (3H, m), 2,26 (3H, s), 2,38–2,51 (2H, m), 2,76 (3H, s), 3,34–3,44 (1H, m), 3,87 (1H, t, J–8,0 Hz), 7,13 (1H, t, J–8,0 Hz), 7,43 (1H, t J–8,0 Hz), 7,56 (1H, d, J–8,0 Hz), 8,21 (1H, s), 8,31 (1H, d, J–8,0 Hz), 11,46 (1H, s). Spectrul¹³C RMN (100,61 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm, J/Hz): 20,26, 22,73, 33,07, 57,00, 67,82, 96,14, 112,12, 119,16, 121,39, 125,19, 125,55, 127,07, 129,89, 134,92, 135,90, 140,99, 141,12.

$T_t - 224...225^\circ C$, $[\alpha]_D - 145,8$ (C_2H_5OH), spectrul UV (λ_{max} , nm): 242, 288, 338, 360 (Бревиколлин – алкалоид осоки парвской. Издательство АН МССР, Кишинев, 1969, с.86).

Calitatea brevicolinei-bază obținute corespunde pentru utilizare în industria farmaceutică și pentru obținerea derivaților sintetici.