



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85927 (13) C2

(51) МПК

A61K 36/28 (2006.01)

A61K 125/00 (2006.01)

A61K 127/00 (2006.01)

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

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З АНТИМІКРОБНОЮ ТА ІМУНОСТИМУЛЮЮЧОЮ АКТИВНІСТЮ

1

2

(21) а200706258

(22) 06.06.2007

(24) 10.03.2009

(46) 10.03.2009, Бюл.№ 5, 2009 р.

(72) ОПРОШАНСЬКА ТЕТЯНА ВІТАЛІЙВНА, UA,
ХВОРОСТ ОЛЬГА ПАВЛІВНА, UA, ДИКИЙ ІГОР
ЛЕОНІДОВИЧ, UA(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ, UA

(56) UA C2 76063, 15.06.2006.

UA C2 77347, 15.11.2006.

RU C1 2171680, 10.08.2001.

RU C2 2250762, 27/04/2005.

RU C1 2254138, 20.06.2003.

RU C2 2296578, 27.10.2006.

RU C2 2308476, 20.10.2007.

UA U 8388, 15.08.2005.

UA U 12351, 15.02.2006.

UA A 70451, 15.10.2004.

(57) 1. Спосіб одержання засобу з антимікробною та імуностимулюючою активністю шляхом багатократної екстракції рослинної сировини спиртом етиловим з подальшою фільтрацією та упарюванням одержаного екстракту, який **відрізняється** тим, що як рослинну сировину використовують листя або корінь лопуха великого, екстракцію здійснюють 40% спиртом етиловим при відношенні сировини до екстрагенту 1:12-1:20.2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що екстракцію здійснюють протягом принаймні 12 годин при 3-4-кратній екстракції сировини.

Винахід відноситься до хіміко-фармацевтичної промисловості, зокрема, до способів одержання комплексів біологічно активних речовин з рослинної сировини, а саме - засобу з антимікробною та імуностимулюючою активністю, який може бути використаний в якості активної субстанції при створенні відповідних лікарських препаратів у різних лікарських формах.

Існують різні способи одержання з рослинної сировини засобів, які проявляють антимікробну активність поряд з іншими видами фармакологічної активності.

Відомий, наприклад, спосіб одержання суми поліфенолів з антимікробною, протизапальною та діуретичною активністю [1] шляхом дрібного екстрагування 70% спиртом етиловим суплідь душекїї зеленої протягом 13-15 годин при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:9-1:11 з подальшим упарюванням сумарного екстракту та його обробкою подвійною кількістю етилацетату.

До недоліків відомого способу можна віднести необхідність додаткової стадії обробки етилацетатом. До спектру фармакологічної активності екстракту, одержаного таким способом, не входить імуностимулююча дія.

Відомий також спосіб одержання засобу з протизапальною, антимікробною та діуретичною дією

із листя груші [2], який передбачає 5-7 кратну екстракцію сировини 10% спиртом етиловим при відношенні сировини до екстрагенту 1:9-1:11 протягом 9-11 годин з подальшим упарюванням сумарного екстракту до 1/18-1/20 попереднього об'єму.

Засіб одержаний за таким способом має вузько спрямоване призначення, може бути використаний для лікування запальних захворювань сечовидільної системи і не проявляє імуностимулюючу активність.

Завданням винаходу є створення способу одержання засобу з антимікробною та імуностимулюючою дією, який завдяки здійсненню екстракції листя або кореня лопуха 40% спиртом етиловим при інших заявлених параметрах способу, дозволяє одержати практично нетоксичний засіб з комплексною вираженою фармакологічною дією, який може бути використаний як активна речовина при створенні засобів у різних лікарських формах для застосування у різних галузях медицини.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі одержання засобу з антимікробною та імуностимулюючою активністю шляхом багатократної екстракції рослинної сировини спиртом етиловим з подальшою фільтрацією та упарюванням одержаного екстракту, винаходом пе-

(13) C2

(11) 85927

(19) UA

редбачено, що в якості рослинної сировини використовують листя або корінь лопуха, екстракцію здійснюють 40% спиртом етиловим при відношенні сировини до екстрагенту 1:12-1:20.

Згідно з винаходом спосіб здійснюють протягом принаймні 12 годин при 3-4 кратній екстракції сировини.

Лопух великий застосовують як у народній медицині, так і у сучасній фітотерапії. Як лікарську сировину для виготовлення лікувальних засобів використовують звичайно корінь лопуха великого. Згідно з одними джерелами інформації [3] настої з кореня лопуха великого мають діуретичну, потогінну та противиразкову дію. Рекомендовано їх застосування переважно при грипі та застудних захворюваннях. За іншими джерелами [4] настої з кореня лопуха великого проявляють діуретичну та жовчогінну дію.

Авторами виявлено антимікробну активність по відношенню до широкого спектру мікроорганізмів та імуностимулюючу активність засобів не тільки з кореня, але й з нетривіальної сировини - листя лопуха великого,

одержаних шляхом екстракції 40% спиртом етиловим згідно з заявленим способом.

Лопух великий широко росте на всій території України і складає достатню сировинну базу для здійснення заявленого способу.

Експериментальним шляхом в якості екстрагенту було вибрано спирт етиловий за здатністю вичерпно екстрагувати біологічно активні речовини з сировини лопуха великого, крім того, він належить до найпоширеніших екстрагентів, які використовуються у фітохімічних виробництвах. Оптимальна 40% концентрація екстрагенту вибрана дослідним шляхом. Ефективність екстрагенту у різних концентраціях оцінювали за наступними критеріями: вміст екстрактивних речовин та суми окислювальних фенолів. Дані експерименту приведені в табл. 1.

Таблиця 1

Вибір оптимального екстрагенту для отримання засобу за заявленим способом

№ п/п	Вид екстрагенту	Вихід екстрактивних речовин, % (в перерахунку на абсолютно суху сировину)		Вихід суми окислювальних фенолів, % (в перерахунку на абсолютно суху сировину)	
		листя	корінь	листя	корінь
1	вода	38,00	65,72	2,11	3,79
2	10%-спирт	48,53	59,79	4,24	4,14
3	20%-спирт	34,79	61,37	3,12	4,64
4	30%-спирт	35,73	61,74	4,46	4,71
5	40%-спирт	40,49	62,74	5,93	4,99
6	50%-спирт	32,30	56,59	2,70	4,80
7	60%-спирт	38,37	46,15	2,81	5,08
8	70%-спирт	28,70	38,63	3,36	4,80
9	80%-спирт	30,40	28,96	3,57	5,03
10	96%-спирт	30,77	9,47	2,71	2,19

Примітка: результати є середніми 5-х визначень.

За даними табл.1 використання в якості екстрагенту спирту етилового 40% концентрації найоптимальніше з точки зору вмісту як екстрактивних речовин так і суми окислювальних фенолів.

Співвідношення сировина-екстрагент також було вибрано експериментальним шляхом. Вміст

екстрактивних речовин та суми окислювальних фенолів у екстрактах, одержаних при різному співвідношенні сировини до екстрагенту наведені у табл.2.

Таблиця 2

Вибір співвідношення сировини до екстрагенту

№ п/п	Співвідношення сировина-екстрагент	Вміст сполук у перерахунку на повітряно-суху сировину, %			
		екстрактивні речовини		СОФ	
		листя	корінь	листя	корінь
1	1:10	34,14	33,75	3,57	3,34
2	1:12	40,03	37,62	5,67	5,04
3	1:15	40,71	38,08	5,72	5,10
4	1:20	41,29	38,97	5,80	5,17

Примітка: результати є середніми 5-х визначень.

Дані таблиці 2 свідчать, що оптимальним є співвідношення сировини до екстрагенту як 1:12-1:20. Зменшення співвідношення призводить до різкого зниження вмісту як екстрактивних речовин, так і суми окислювальних фенолів у екстрактах, крім того погіршується процес екстракції до повного поглинання екстрагенту сировиною. Збільшення співвідношення економічно недоцільне внаслідок незначного збільшення вмісту екстрагованих речовин при надмірних витратах екстрагенту.

Спосіб здійснюють наступним чином: подрібнені листя або корінь лопуха великого завантажують в екстрактор, заливають 40% спиртом етиловим до дзеркала, екстрагують протягом принаймні 12 годин, екстракт зливають у прийомник. Екстракцію однієї порції сировини повторюють принаймні ще двічі. Отримані екстракти (загальне співвідношення сировина:екстрагент 1:12-1:20) об'єднують, фільтрують та упарюють до густого екстракту. Екстракцію проводять при кімнатній температурі.

Експериментально доведено, що для вичерпної екстракції з сировини комплексу біологічно активних речовин із заданим спектром фармакологічної дії доцільно одну порцію сировини піддавати екстракції 3-4 рази новими порціями екстрагенту при заявленому сумарному співвідношенні сировини до екстрагенту. Об'єднання одержаних екстрактів забезпечує збільшення кількісного виходу та вихідності готового продукту при зменшенні витрат вихідної сировини за рахунок її вичерпної екстракції.

Вихід цільового продукту з листя лопуха великого складає 36-41% від повітряно-сухої маси сировини з втратою маси при висушуванні 22-24%, а з кореня - 33-38% з втратою маси при висушуванні - 22-23%.

Характеристика кінцевого продукту, одержано-го за заявленим способом:

Густий екстракт листя лопуха великого - темно коричнева густа маса з сильним кислуватим запахом, гірко-кисла на смак. Легко розчинний у гарячій воді, розчинний у холодній воді та не розчинний в 96% спирті етиловому та хлороформі.

Густий екстракт кореня лопуха великого - коричнева густа маса з легким приємним специфічним запахом, терпкувато-солодко-кисла на смак. Легко розчинний у гарячій воді, розчинний у холодній воді та не розчинний в 96% спирті етиловому та хлороформі.

Спосіб ілюструється прикладами.

Приклад 1

5кг подрібненого та просіяного крізь сито №1000 листя лопуха великого завантажують у екстрактор, заливають 57л 40% спирту етилового (з врахуванням коефіцієнту поглинання екстрагенту), екстрагують протягом 12 годин, екстракт зливають в прийомник. Екстракцію проводять ще двічі порціями по 20л 40%-спирту етилового. Отримані екстракти (загальне співвідношення сировина:екстрагент 1:12) в обсязі 57л об'єднують, фільтрують та упарюють до густої консистенції (вміст во-

логи 22,42%). Екстракцію здійснюють настоюванням при кімнатній температурі.

Вихід цільового продукту складає 40,40% від повітряно-сухої маси сировини.

Аналогічним чином екстракції піддають 5кг подрібненого кореня лопуха. Одержують 58л об'єданого екстракту, який фільтрують та упарюють до густої консистенції (вміст води 22,87%).

Вихід цільового продукту складає 37,41% від повітряно-сухої маси сировини.

Приклад 2

По 5кг подрібнених та просіяних крізь сито №1000 листя та кореня лопуха великого окремо завантажують у різні екстрактори, листя заливають 72л 40% спирту етилового (з врахуванням коефіцієнту поглинання екстрагенту) а корінь 65л 40% спирту етилового (з врахуванням коефіцієнту поглинання екстрагенту), екстрагують протягом 12 годин, екстракти зливають в прийомники. Екстракцію проводять аналогічно двічі порціями по 20л 40%-спирту етилового. Отримані екстракти (загальне співвідношення сировина-екстрагент 1:15) у обсязі 71л для листя та 73л для кореня об'єднують, фільтрують і упарюють до густої консистенції (вміст води 22,14% для листя та 22,58% для кореня). Екстракцію здійснюють настоюванням при кімнатній температурі.

Вихід цільового продукту складає для листя 41,10% від маси повітряно-сухої сировини, для кореня - 38,25%.

Приклад 3

По 5кг подрібнених та просіяних крізь сито №1000 листя і корінь лопуха великого окремо завантажують у екстрактори, заливають 77л -листя (з врахуванням коефіцієнту поглинання екстрагенту) та 70л - корінь (з врахуванням коефіцієнту поглинання екстрагенту) 40% спирту етилового, екстрагують протягом 12 годин, екстракти зливають у прийомники. Екстракцію проводять ще двічі порціями по 30л 40%-спирту етилового. Отримані екстракти (загальне співвідношення сировина-екстрагент 1:20) в обсязі для листя 95л та для кореня 97л об'єднують, фільтрують, упарюють у вакуумі до густої консистенції (вміст води 22,36% для листя та 22,52% для кореня). Екстракцію здійснюють настоюванням при кімнатній температурі.

Вихід цільового продукту складає для листя 41,87% від маси повітряно-сухої сировини, для кореня - 39,05%.

Приклад 4

Дослідження антимікробної активності засобів у формі густих екстрактів листя та кореня лопуха великого, одержаних за заявленим способом, проводились методом дифузії в агар (метод „колодязів”) з використанням двошарової заливки чашок. Як тест-культури використовували музейні штами бактерій та грибів: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ATCC 6538, *Echerichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 885/653, *Streptococcus pyogenes* Disk-1 та клінічні штами - 2 штами *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidemidis*, 2 штами *Streptococcus pyogenes*, *Echerichia coli*, *Candida krosera*.

В якості критерію оцінки антимікробної активності обрано діаметр зон затримки росту мікроор-

ганізмів під впливом досліджуваних засобів. Результати дослідження приведені в табл.3.

Таблиця 3

Вивчення антимікробної активності засобів у формі густих екстрактів листя та кореня лопуха, одержаних за заявленим способом, по відношенню до музейних та клінічних штамів методом дифузії в агар (n=5)

№ п/п	Вид мікроорганізму	Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів (мм), під дією	
		густого екстракту листя лопуха, 200мкг/мл	густого екстракту кореня лопуха, 200мкг/мл
Музейні штами мікроорганізмів			
1	S.aureus ATCC 25923	14,80	13,80
2	S.aureus ATCC 6538	14,80	12,40
3	E.colii ATCC 25922	13,60	12,00
4	B.subtillis ATCC 6633	12,40	15,20
5	C.albicans ATCC 85/653	13,80	-
6	S. pyogenes Dick-1	12,40	12,20
Клінічні штами мікроорганізмів			
7	S.aureus	13,80	-
8	S.aureus	16,20	-
9	S. epidemidis	22,80	15,80
10	S. pyogenes	13,80	-
11	S. pyogenes	17,80	11,80
12	E.coli	12,20	-
13	Ckrosera	12,20	-

Примітка: - затримка росту мікроорганізмів не виявлена; результати є середніми 5-х визначень

Аналіз даних табл.3 свідчить, що густі екстракти листя та кореня лопуха великого, одержані за заявленим способом, виявили досить виражену антимікробну активність по відношенню до музейних та клінічних штамів мікроорганізмів, а її спектр достатньо широкий. Причому засіб з листя лопуха великого проявляє антимікробну активність дещо вищу та по відношенню до більшого переліку патогенних мікроорганізмів, ніж засіб з кореня лопуха. Найбільш виражена антимікробна активність густого екстракту листя лопуха великого спостерігалась по відношенню до S.epidemidis, S.pyogenes та S.aureus, а густого екстракту кореня лопуха великого - до S.epidemidis та B.subtilis ATCC 6633.

Приклад 5

Дослідження впливу засобів у формі густих екстрактів листя і кореня лопуха великого, одержаних за заявленим способом, на імунну систему проводили за методом Т-розеткоутворення, який оснований на несподіваному розеткоутворенні лімфоцитів людини з еритроцитами барана Гепаризовану кров з ліктьової вени, розбавляли розчином Рінгера в співвідношенні 1:2, наслиювали на градієнт щільності фікол-велографін (1,077) та центрифугували 15хв при 3000об/хв. Отримане лімфоцитарне кільце переносили в мірну центрифужну пробірку і відмивали фізичним розчином - отримували чисту суміш лімфоцитів крові людини.

Вплив густих екстрактів листя та кореня лопуха великого на імунітет вивчали в концентраціях 1,25%; 0,62%; 0,5%; 0,3%. В якості препаратів порівняння використовували рекутан та настоянку ехінацеї.

До 0,1мл чистої суміші лімфоцитів додавали 0,02 мл розведених екстрактів та препаратів порівняння, інкубували протягом 15хв при температурі 37°C. Потім додавали 0,1мл 1% суміші еритроцитів барана, інкубували протягом 10хв при температурі 37°C. Зупинку реакції проводили шляхом центрифугування протягом 2хв при 1500 об/хв. Після чого під мікроскопом підраховували кількість лімфоцитів та розеткоутворюючих клітин (Т-РУК) (лімфоцитів, що приєднали 3 і більш еритроцитів). Результати вивчення впливу засобів у формі густих екстрактів листя та кореня лопуха великого, одержаних за заявленим способом, на клітинний ланцюг імунної системи приведені в табл. 4.

Аналіз даних табл. 4 свідчить, що густий екстракт листя лопуха великого у концентрації 0,3% та густий екстракт кореня у концентрації 0,5% більш впливали на клітинну ланку імунної системи, ніж препарати порівняння - рекутан та настоянка ехінацеї. Також густий екстракт листя в концентрації 0,5% показав кращі результати з Т-розеткоутворення, ніж рекутан та незначно поступався ефекту настоянки ехінацеї, а густий екстракт кореня в концентрації 1,25-0,62% впливав на клітинний імунітет на рівні референс-препаратів.

Таблиця 4

Вивчення впливу засобів у формі густих екстрактів листя та кореня лопуха великого, одержаних за заявленим способом, на клітинний ланцюг імунної системи

№ п/п	Субстанції, що вивчалися	Т-РУК (%)						
		контроль	Рекутан	Н-ка ехінацеї	Концентрації експериментальних проб досліджуваних екстрактів, %			
					1,25	0,62	0,50	0,30
1	густий екстракт листя лопуха	64,00	67,67	70,74	63,40	65,40	70,70	72,18
2	густий екстракт кореня лопуха	58,68	63,38	65,48	65,20	65,36	66,28	62,16

Примітка: результати є середніми 5-х визначень.

Дані проведених експериментів свідчать про наявність вираженої імуностимулюючої дії у засобів, одержаних за заявленим способом.

Таким чином, заявлено спосіб одержання засобу з антимікробною та імуностимулюючою дією з листя або кореня лопуха великого. Спосіб простий у виконанні, передбачає застосування екстрагенту, дозволеного для використання у хіміко-фармацевтичному виробництві. Спосіб екологічно безпечний і може бути здійснений в промислових умовах з використанням стандартного обладнання.

В результаті здійснення способу одержують засіб з вираженою антимікробною та імуностимулюючою активністю при використанні в якості сировини як листя, так і кореня лопуха великого. Одержаний засіб практично нетоксичний, позбавлений алергенної дії. Він може бути застосований як діюча речовина лікарських засобів у різних лі-

карських формах для профілактики і лікування захворювань, що передбачають застосування антимікробних засобів та зміцнення імунної системи.

Джерела інформації:

1. Патент 76063, Україна, МПК (2006) А61К36/185, А61Р31/00, заявл. 04.01.2005, опубл. 15.06.2006, Бюл. №6.

2. Патент 77347, Україна, МПК (2006) А61К36/185, А61К127/00 (2006.01), А61Р29/00, А61Р31/00, А61Р13/00, заявл. 26.04.2005, опубл. 15.11.2006, Бюл. №11.

3. Современная фитотерапия. / Под ред. В.Петкова. - София, «Медицина и физкультура», 1988. - С.315-316.

4. Фитотерапия в клинике внутренних болезней. // Б.А.Самура, В.Ф.Черных, И.П.Банний и др. // Х.: Изд-во НФаУ, «Золотые страницы», 2003.- с.336.