



УКРАЇНА

(19) UA (11) 96694 (13) C2

(51) МПК (2011.01)

A61K 36/882 (2006.01)

A61K 125/00 (2006.01)

A61P 3/00

A61P 31/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З АНАБОЛІЧНОЮ, АДАПТОГЕННОЮ, АНТИМІКРОБНОЮ АКТИВНІСТЮ**

1

2

(21) а201010252

(22) 20.08.2010

(24) 25.11.2011

(46) 25.11.2011, Бюл.№ 22, 2011 р.

(72) КОВАЛЬОВ СЕРГІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ, ЗАТИЛЬНИКОВА ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА, ДЕРКАЧ НАТАЛЬЯ ВОЛОДИМИРІВНА, ОСОЛОДЧЕНКО ТЕТЯНА ПАВЛІВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(56) UA 86502 C2, 27.04.2009.

UA 14493 U, 15.05.2006.

UA 33401 U, 25.06.2008.

UA 77347 C2, 15.11.2006.

UA 16992 U, 15.09.2006.

RU 2123349 C1, 20.12.1998.

RU 2340216 C1, 10.12.2008.

RU 2110187 C1, 10.05.1998.

(57) Спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з анаболічною, адаптогенною та антимікробною активністю шляхом трикратної екстракції рослинної сировини водою при загальному співвідношенні сировини до екстрагенту 1:20 при постійно підтримуваній температурі 90 °С з подальшою фільтрацією та упарюванням у вакуумі об'єднаних екстрактів до сухого порошку, який **відрізняється** тим, що екстракції піддають корневища півників болотяних, першу екстракцію проводять при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 протягом 2,0 годин, другу та третю - 1:5 відповідно по 1 годині кожна.

Винахід належить до фармації та медицини, а саме до способів одержання засобів рослинного походження, зокрема комплексу біологічно активних речовин з анаболічною, адаптогенною та антимікробною активністю.

Однією з важливих проблем фармації та медицини є фармакологічна регуляція білкового обміну, порушення якого у вигляді збільшення процесів катаболізму та затримки синтезу протеїнів спостерігається при цілому ряді захворювань. Препарати з анаболічною дією широко представлені синтетичними та гормональними засобами. Але побічні дії цих засобів спонукають до створення нових препаратів, що добре переносяться та практично не мають протипоказань.

Відомий спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з антиоксидантною та проти-запальною дією [1] шляхом неодноразової екстракції листя кукурудзи гарячою водою при температурі 90 °С при загальному співвідношенні сировина:екстрагент 1:20 протягом 2 годин з подальшим упарюванням досуха одержаного сумарного екстракту.

Наведений спосіб не забезпечує одержання комплексу біологічно активних речовин з анаболічною, адаптогенною та антимікробною активністю.

Відомий спосіб одержання засобу з проти-запальною та анаболічною активністю [2] листя евкаліпту водою при співвідношенні сировина:екстрагент 1:3-1:9 при температурі 90-100 °С протягом 1,5-2 годин з подальшим настоюванням протягом 11-12 годин, фільтрацією та упарюванням одержаного рідкого екстракту до 1/20-1/22 попереднього об'єму, очищенням шляхом відстоювання надосадової рідини, яку піддають стерилізації.

До недоліків відомого способу можна віднести використання сировини, яка не культивується в Україні. Крім того, кінцевий продукт не проявляє адаптогенної та антимікробної дії.

Найближчим до заявленого способу за сукупністю ознак є спосіб одержання біологічно активної субстанції з трави сої щетинистої з анаболічною дією [3], який передбачає двоступеневу екстракцію рослинної сировини гарячою водою при постійному підтримуванні температурі 100-105 °С при співвідношенні сировина:екстрагент 1:39-1:41 протя-

(19) UA (11) 96694 (13) C2

гом 2 та 0,5 годин відповідно з подальшою фільтрацією та упарюванням об'єднаних екстрактів до густої консистенції з вмістом сухого залишку 65-75 %. Загальний вихід екстрактивних речовин 32,44 % від повітряно-сухої сировини.

Вищезазначений спосіб не дозволяє одержати засіб з комплексною анаболічною, адаптогенною та антимікробною активністю [3].

Задачею винаходу є створення нового способу одержання комплексу біологічно активних речовин шляхом екстракції кореневища півників болотяних водою при заданих умовах, в результаті чого одержують біологічно активну субстанцію у вигляді сухого екстракту з анаболічною, адаптогенною та антимікробною дією, яка може бути використана як діюча речовина у складі лікарських засобів, використаних у різних лікарських формах і придатних до тривалого застосування внаслідок м'якої дії, низької токсичності і відсутності побічних ефектів.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі одержання засобу з діуретичною, антимікробною та анаболічною дією шляхом трикратної екстракції рослинної сировини дистильованою водою при температурі 90 °C з подальшою фільтрацією та упарюванням у вакуумі об'єднаних екстрактів до сухого порошку згідно з винаходом передбачено, що як рослинну сировину використовують кореневища півників болотяних, першу екстракцію здійснюють при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 протягом 2,0 годин, другу та третю - 1:5 відповідно по 1 годині кожна.

Заявлений спосіб одержання передбачає використання як рослинної сировини кореневища півників болотяних. У народній медицині відомі дані про використання кореневища півників болотяних як відхаркувальних, в'яжучих, протизапальних, сечогінних, кровоспинних засобів [4]. Авторами вперше було виявлено анаболічну, адаптогенну та антимікробну активність біологічно активних речовин, одержаних з кореневища півників болотяних заявленим способом.

Всі параметри заявленого способу визначено експериментальним шляхом з урахуванням біологічної активності одержаних комплексів, ефективності, доступності та нешкідливості реактивів, практичного відтворення способу у промислових умовах.

Вибір екстрагента було здійснено експериментальним шляхом, виходячи з кількості одержаних екстрактивних речовин, вартості та екологічної безпечності екстрагента. Такий екстрагент є дешевим, доступним та екологічно безпечним.

Сумарне співвідношення сировина:екстрагент 1:20 встановлено експериментальним шляхом та є оптимальним для даного виду сировини. При зменшенні кількості екстрагенту погіршується процес екстракції. Збільшення екстрагенту понад задане співвідношення економічно недоцільне.

Загальна тривалість усіх етапів екстракції складає 4 години і є достатньою для вичерпного вилучення з сировини комплексу біологічно активних речовин з анаболічною, адаптогенною та антимікробною активністю.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином. Подрібнену сировину з кореневища півників болотяних піддають трикратній екстракції дистильованою водою при загальному співвідношенні сировина:екстрагент 1:20 та загальній тривалості екстракції - 4 години при температурі 90 °C.

Першу екстракцію здійснюють при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 протягом 2,0 годин, другу та третю при співвідношенні - 1:5 протягом 1 години кожна. Одержані водні екстракти об'єднують, відфільтровують та упарюють у вакуумі до одержання сухого темно-жовтого з характерним запахом порошку. Вихід готового продукту становить 42,48 %.

Винахід ілюструється прикладами.

#### Приклад 1

1,0 кг подрібненого кореневища півників болотяних залили 10,0 л дистильованої води і екстрагували при періодичному перемішуванні та постійно підтримуваній температурі 90 °C протягом 2,0 годин. Процес повторили ще двічі порціями екстрагенту по 5,0 л протягом 1 години після кожного додавання екстрагенту. Одержані екстракти відфільтрували під вакуумом, об'єднали і упарили у вакуум-ротаційному апараті при температурі 90-100 °C до отримання сухого продукту. Вихід сухого екстракту склав 42,48 %.

#### Приклад 2

Вивчення анаболічної активності комплексу біологічно активних речовин, одержаних за заявленим способом, проводились на моделі примусового плавання з навантаженням на статеві незрілі щури [5]. Як інтегральні критерії анаболічної дії було обрано: приріст загальної маси тіла та литкового м'язу дослідних тварин відносно інтактного контролю, вміст загального білка у тканинах внутрішніх органів та литковому м'язі, вміст сечовини у сироватці крові.

Досліди проводилися на білих нелінійних щурах масою 60,0±5,0 г. Тварин поділили на 3 групи та протягом всього досліді (21 день) утримували в умовах віварію на традиційному водно-харчовому раціоні. Групи тварин характеризувалися таким чином: 1 група - інтактний контроль; 2 - тварини, що одержували екстракт, одержаний за заявленим способом, у дозі 150 мг/кг; 3 - тварини, що одержували препарат порівняння, а саме калію оротат у дозі 100 мг/кг.

На 21 добу від початку експерименту всіх тварин зважували та виводили з експерименту шляхом декапітації під тіопентаноловим наркозом, після чого препарували та визначали масу внутрішніх органів (серця, печінки, нирок) та литкового м'язу. Основні біохімічні показники білкового обміну встановлювали за допомогою стандартних діагностичних наборів: загальний білок крові - біуретовим методом, сечовину крові та сечі за допомогою тест-набора Biotest, UREA450, загальний білок у тканинах - методом Лоурі у модифікації Міллера.

Результати дослідження наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Вивчення анаболічної активності комплексу біологічно активних речовин, одержаного за заявленим способом

Досліджуваний показник	Умови експерименту		
	Інтактний контроль	Екстракт з кореневища півників болотяних, 150 мг/кг	Калію оротат, 100 мг/кг
Приріст маси тіла, г	20,7±1,4	39,8±2,1*	30,1±2,2*
Масовий коефіцієнт печінки, %	5,24±0,31	5,38±0,24	5,41±0,35
Масовий коефіцієнт серця, %	0,43±0,02	0,53±0,24	0,52±0,02
Масовий коефіцієнт нирок, %	1,01±0,05	1,15±0,04	1,01±0,02
Кількість білка у литковому м'язі, мг/100 мг тканини	54,0±3,0	100,5±10,5*	60,3±4,9
Кількість білка у серці, мг/100 мг тканини	48,1±4,0	85,0±9,0*	64,9±6,3
Сечовина у сироватці крові, ммоль/л	7,51±1,7	3,8±2,8*	6,9±2,2
Сечовина у сечі, ммоль/л	106,9±2,3	66,0±1,2*/**	95,8±1,9

Примітка: \* $p \leq 0,05$ , відхилення вірогідне відносно контролю,

\*\* $p \leq 0,05$ , відхилення вірогідне відносно препарату порівняння.

Одержані результати свідчать, що 21-денне застосування комплексу біологічно активних речовин з кореневища півників болотяних, одержаного за заявленим способом, на моделі примусового плавання з вантажем у дозі 150 мг/кг викликає анаболічний ефект, який виявляється у достовірному збільшенні маси литкового м'язу і вмісту рівня білка в тканинах м'яза та серці. Під впливом досліджуваного засобу відмічається зниження вмісту сечовини у сироватці крові та у сечі відносно контролю та препарату порівняння, що не прямо свідчить про стимуляцію білковосинтетичних процесів в організмі та підтверджує анаболічну активність.

### Приклад 3

Ерготропну дію комплексу біологічно активних речовин, одержаних за заявленим способом досліджували на білих нелінійних щурах масою 60,0±5,0 г на моделі примусового плавання з навантаженням і оцінювали за здатністю зменшувати час втоми [6]. Тварин було поділено на групи в залежності від одержуваного препарату. Навантаження прикріплювали до основи хвоста щурів за допомогою резинового кільця (7,5 % від маси тіла). Показники знімали до введення досліджуваних засобів та через 11 та 28 днів.

Результати дослідження наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Ерготропна дія комплексу біологічно активних речовин, одержаного за заявленим способом

Умови досліджу	Вихідні дані, (с)	Фізична витривалість	
		11 день	28 день
Контроль	152,1±19,7	150,7±20,1	150,7±20,1
Комплекс біологічно активних речовин, 150 мг/кг	150,2±19,0*	189,7±17,5*	216,7±24,0*/**
Калію оротат, 100 мг/кг	150,9±20,3	175,9±21,2	190,9±17,4

Примітка: \* $p \leq 0,05$ , відхилення вірогідне по відношенню до контролю,

\*\* $p \leq 0,05$ , відхилення вірогідне по відношенню до препарату порівняння.

Аналіз даних таблиці 2 свідчить, що комплекс біологічно активних речовин з кореневища півників болотяних, одержаний за заявленим способом впливає на вірогідне збільшення часу фізичної витривалості у порівнянні з вихідними даними та препаратом порівняння.

Після 7-денного введення досліджуваних засобів вивчали функціональний стан центральної нервової системи щурів за методом "відкритого поля" [6, 7].

Результати дослідження наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Вплив комплексу біологічно активних речовин, одержаних за заявленим способом на поведінку щурів в тесті "Відкритого поля"

Умови досліджу	Час виходу з центру	Кількість заглядань	Кількість стойок	Грумінг	Пересічені квадрати
Контрольна група	6,8±0,6	9,6±1,0	1,6±0,6	0,8±0,4	14,2±1,6
Комплекс біологічно активних речовин, 150 мг/кг	2,4±0,2*	17,1±1,0*	4,8±1,0*	2,6±1,0*	20,4±1,4*
Калію оротат, 100 мг/кг	4,0±0,9	9,7±0,4	2,1±0,8	0,7±1,2	17,3±2,1

Аналіз даних таблиці 3 свідчить, що комплекс біологічно активних речовин з кореневища півників болотяних, одержаний за заявленим способом сприяє достовірному підвищенню локомоторної активності, не пригнічує дослідницької поведінки та не викликає змін інших показників емоційного стану інтактних тварин. Що свідчить про наявність вираженого стимулюючого, активізуючого та тонізуючого впливу на ЦНС комплексу біологічно активних речовин, одержаного за заявленим способом. Отже, анаболізуюча та адаптогенна дія комплексу біологічно активних речовин достовірно переважає препарат порівняння.

#### Приклад 4

Антимікробну активність біологічно активних речовин кореневища півників болотяних, одержаного за заявленим способом, вивчали, використовуючи метод дифузії агар та набір еталонних

штамів: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Eschericia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Basillus subtilis* ATCC 6633, *Candida ablicans* ATCC 885/653 [8]. Мікробне навантаження до музейних штамів становило  $10^7$  мікробних кліток на 1 мл середовища та визначалося за оптичним стандартом мутності McFarland.

Сумарний препарат з кореневища півників болотяних розчиняли у воді дистильованій, ДМСО, 40 % та 50 % спирті етиловому. Концентрація досліджуваних екстрактів становила 10,0 % та 20,0 %. Як контроль використовували чисті розчинники у концентраціях, що відповідають їх вмісту у препаратах. Дані дослідження наведені у таблиці 4.

Таблиця 4

Вивчення антимікробної активності комплексу біологічно активних речовин, одержаного за заявленим способом

Розчинник	Діаметр зон затримки росту мікроорганізмів у мм, $M \pm m$ , $p \leq 0,05$						
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Eschericia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Basillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida ablicans</i> ATCC 885/653
1	2	3	4	5	6	7	8
10,0 % розчин БАР							
Вода	22,3±1,52	20,2±0,90	17,5±2,05	21,5±0,92	21,5±0,92	24,3±1,52	14,0±1,30
ДМСО	17,4±1,19	19,1±1,36	16,8±0,80	18,5±0,92	18,5±0,92	22,3±1,52	14,7±0,75
40 % спирт етиловий	18,5±0,92	19,6±0,76	17,5±0,92	19,1±1,36	18,5±0,92	22,8±1,52	15,5±0,92
50 % спирт етиловий	19,3±1,52	20,4±1,19	17,3±1,52	18,5±0,92	18,5±0,92	22,3±1,52	15,5±0,92
20,0 % розчин БАР							
Вода	19,4±1,19	19,1±1,36	17,3±1,52	15,5±0,92	15,5±0,92	21,5±0,92	14,0±1,30
ДМСО	18,5±0,92	18,5±0,92	15,5±0,92	14,7±0,75	14,7±0,75	22,8±1,52	13,5±0,92
40 % спирт етиловий	18,0±1,84	17,5±0,92	17,5±0,92	ріст	ріст	21,5±0,92	12,5±0,92
50 % спирт етиловий	19,3±1,52	20,2±0,90	17,3±1,52	ріст	ріст	22,8±1,52	12,5±0,92
Контроль							
Вода	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст
ДМСО	13,5±0,92	12,5±0,92	11,5±0,92	ріст	11,6±0,80	14,0±1,29	ріст
40 % спирт етиловий	12,6±0,80	11,6±0,80	11,6±0,80	11,5±0,92	11,5±0,92	12,6±1,52	ріст
50 % спирт етилови	14,0±1,29	11,6±0,80	12,5±0,92	11,6±0,80	12,5±0,92	13,5±0,92	11,5±0,92

Аналіз даних таблиці 4 свідчить, що комплекс біологічно активних речовин з кореневища півників болотяних, одержаного за заявленим способом, проявляє антимікробну активність відносно усіх тест-штамів мікроорганізмів. Діаметри зон затримки росту відносно *S.aureus*, *E.coli* та *B.subtilis* складає 16-24 мм, *P.aeruginosa* 15-21 мм, відносно *C.ablicans* 12-14 мм, що вказує на чутливість мікроорганізмів до екстракту. Досліджуваний екстракт виявив слабку антимікробну дію лише відносно грибів. Найбільш виражену антимікробну активність проявляли екстракти, розведені у ДМСО та спирті.

Таким чином, заявлено новий спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з анаболічною, адаптогенною та антимікробною активністю. Спосіб є простим у відтворенні, економічним, екологічно безпечним та може бути здійснений в умовах промислового виробництва з використанням стандартного обладнання. Екстракт, одержаний за заявленим способом, проявляє виражену анаболічну, адаптогенну та антимікробну дію і є перспективним для створення нових лікарських засобів для лікування та регуляції білкового обміну.

Джерела інформації:

1. Патент на винахід 86502, Україна, МПК(2006) А61К 36/899 (2006.01), А61К 127/00 (2006.01), А61Р 7/10 (2009.01), А61Р 11/02 (2009.01), А61Р 17/08 (2009.01), А61Р 39/06 (2009.01), А61Р 43/00. Спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з антиоксидантною та протизапальною дією. Заявка а200708446, заявл. 23.07.2007, опубл. 27.04.2009, Бюл. №8.

2. Патент на корисну модель 14493, Україна, МПК(2006) А61К 36/61 (2007.01), А61К 127/00 (2007.01), А61К 9/14. Спосіб одержання засобу з протизапальною та анаболічною активністю. Заявка u200511277, заявл. 28.11.2005, опубл. 15.05.2006, Бюл. №5.

3. Патент на корисну модель 33401, Україна, МПК(2006) А61К 36/48 (2008.01). Спосіб одержання біологічно активної субстанції рослинного походження з анаболічною дією. Заявка u200800470, заявл. 14.01.2008, опубл. 25.06.2008, Бюл. №12.

4. Растительные ресурсы России и сопредельных государств: цветковые растения, их химический состав, использование: семейства Butomaceae-Turphaceae. - СПб.: Наука, 1994. - с. 77-82.

5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников. - Москва "МЕД-пресс-информ", 2004. - 924 с.

5. Берхин Е.Б. Методы изучения влияния новых химических соединений на функцию почек // Хим.-фармац. журн. - 1977. - Т. 11. - №5. - с. 3-11.

6. Експериментальне вивчення нових адаптогенних засобів: Методичні рекомендації / Л.Я. Яковлева, О.Я. Міщенко та ін. - Київ, 2009. - 36 с.

7. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) за редакцією член-кореспондента АМН України О.В. Стефанова. - К.: Авіцена, 2001. - 528 с.

8. Державна фармакопея України / МОЗ України. - 1-е вид. - Х.: 2001. - С. 110-134.