



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110664** (13) **C2**

(51) МПК (2016.01)

A61K 36/73 (2006.01)**A61P 31/04** (2006.01)**A61P 29/00**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2014 04267	(72) Винахідник(и): Козира Софія Андріївна (UA), Сербін Анатолій Гаврилович (UA), Кулагіна Марія Андріївна (UA), Радько Олена Вікторівна (UA), Гонтова Тетяна Миколаївна (UA), Осолодченко Тетяна Павлівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 22.04.2014	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.01.2016	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 69626 A, 15.09.2004 UA 59681 A, 15.09.2003 UA 76063 C2, 15.06.2006 UA 87065 C2, 10.06.2009 UA 20253 U, 15.01.2007 UA 49151 U, 26.04.2010 Козира С. А. Вивчення кількісного вмісту гідроксикоричних кислот у вегетативних органах рослин роду <i>Geum</i> L //Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. - 2012. - №. 6. - С. 54-58. Козира С. А., Кулагіна М. А., Сербін А. Г. Хімічний склад та використання в медицині рослин роду <i>Geum</i> L.(огляд літератури) //Запорожский медицинский журнал. - 2008. - №. 2 (2). - С. 80-82. Козира С. А., Кулагіна М. А., Радько О. В. Визначення оптимальних умов екстракції поліфенольних сполук з трави <i>Geum urbanum</i> L //Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. - 2014. - №. 3.- С. 84-88.
(41) Публікація відомостей про заявку: 26.10.2015, Бюл.№ 20	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.01.2016, Бюл.№ 2	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ СУМИ ПОЛІФЕНОЛІВ З АНТИМІКРОБНОЮ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ДІЄЮ З ТРАВИ ГРАВІЛАТУ МІСЬКОГО**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу одержання суми поліфенолів шляхом екстракції рослинної сировини з подальшим упарюванням, фільтрацією та сушінням об'єднаного екстракту. Екстракції піддають траву гравілату міського (*Geum urbanum*), як екстрагент використовують гарячу воду температурою 95 °С при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:10. Проводять екстракцію протягом 2-х годин, після чого сировину додатково промивають екстрагентом у кількості до 40 % від заданого співвідношення, а зливи об'єднують з сумарним екстрактом.

UA 110664 C2

Винахід належить до хіміко-фармацевтичної промисловості, зокрема до способів отримання біологічно активних речовин з рослинної сировини.

У сучасній медичній практиці широко використовуються біологічно активні засоби природного походження. Лікарські препарати на основі рослинної сировини виглядають дуже привабливими завдяки низці позитивних властивостей: максимальній спорідненості до організму людини, більшою безпечністю відносно побічної дії, незначною алергійністю і токсичністю, можливістю тривалого використання без формування звикання.

Біологічна активність рослинної сировини значною мірою обумовлена кількісним та якісним вмістом поліфенольних сполук.

Відомий спосіб одержання комплексу поліфенольних сполук з протизапальною, кардіопротекторною та антиоксидантною дією [1]. Спосіб полягає в екстракції трави чини весняної 50 % спиртом етиловим при співвідношенні сировина: екстрагент 1:7 протягом 47 годин з наступним

упарюванням одержаного екстракту до 1/7-1/8 попереднього об'єму, обробкою упареного екстракту спиртом етиловим, відокремленням надосадової рідини, її упарюванням і сушінням.

Недоліком наведеного способу можна вважати його відносно високу тривалість.

Відомий також спосіб одержання суми поліфенолів з антимікробною, протизапальною та діуретичною активністю [2] шляхом екстракції 70% спиртом етиловим суплідь душекії зеленої (*Duschekia viridis*) протягом ПІ 5 годин при співвідношенні сировина:екстрагент 1:9-1:11 з подальшим

упарюванням до водного залишку, фільтрацією, обробкою етилацетатом у співвідношенні сумарний екстракт:етилацетат 1:2.

Недоліком наведеного способу можна вважати використання токсичного екстрагенту етилацетату.

Найближчим до заявленого є спосіб одержання поліфенольного комплексу «Флавітін» з протизапальною, анальгетичною, противиразковою та антиоксидантною активністю [3] шляхом екстракції 50% спиртом етиловим листя винограду, краще сорту Дабуги, при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 з подальшим упарюванням до водного залишку, фільтрацією, ресорбцією фенольних сполук з осаду водою, об'єднанням фільтрату з одержаним водним розчином, упарюванням і сушінням.

Наведений спосіб дозволяє одержати поліфенольний комплекс з широким спектром фармакологічної дії, проте використана рослинна сировина не є загальнодоступною, ареал її розповсюдження обмежений субтропічною зоною і екстрагент спирт етиловий є дорогим.

Задачею винаходу є створення способу одержання суми поліфенолів з рослинної сировини, який шляхом екстракції гарячою водою трави гравілату міського *Geum urbanum* при заданих параметрах способу забезпечує одержання екстракту з вираженою антимікробною та протизапальною активністю.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі одержання суми поліфенолів з антимікробною та протизапальною дією шляхом принаймні трикратної екстракції рослинної сировини гарячою водою ($t\ 95^{\circ}\text{C}$) з подальшим упарюванням, фільтрацією та сушінням об'єднаного екстракту. Винаходом передбачено, що екстракції піддають траву гравілату міського *Geum urbanum* при додатковому співвідношенні сировини до екстрагенту 1:10 протягом 2 години, після чого сировину додатково промивають екстрагентом у кількості до 40 % від заданого співвідношення, а зливи об'єднують з сумарним екстрактом.

Як сировину вибрано траву гравілату міського *Geum urbanum* родини розові, який широко розповсюджений на всій території України.

Саме вибір рослинної сировини у поєднанні з параметрами заявленого способу обумовлює одержання кінцевого продукту з необхідним спектром фармакологічних властивостей, дозволяє розширити арсенал існуючих біологічно активних речовин, придатних до одержання лікарських засобів у різних лікарських формах, надаючи тим самим можливість індивідуального підходу до лікування хворих.

У народній медицині існують окремі відомості про помірну в'язучу та заспокійливу дію відварів трави гравілату міського [5].

Авторами вперше було виявлено антимікробну та протизапальну активність суми поліфенолів трави гравілату міського - *Geum urbanum*, одержаних заявленим способом.

Вибір як екстрагент води гарячої було здійснено експериментальним шляхом, виходячи з умов максимальної екстракції поліфенольних сполук з вибраної сировини.

У процесі досліджень були визначені температура екстрагенту, також співвідношення сировини до екстрагенту і час екстракції. Дані експериментів наведено у таблицях 1 -3.

Таблиця 1

Визначення оптимальної температури екстрагенту при екстракції трави гравілату міського у відповідності з заявленим способом

№ досліду	Температура екстрагенту, °C	Вихід готового продукту, %	Вихід діючих речовин, %
1	80	17,9	37,15
2	90	19,2	38,35
3	95	20,1	40,62
4	97	20,0	40,52
5	100	20,0	40,52

Згідно з даними табл. 1 оптимальним екстрагентом для заявленого способу є гаряча вода при температурі 95 °C.

5

Таблиця 2

Визначення оптимального співвідношення сировина:екстрагент при екстракції трави гравілату міського гарячою водою (t 95 °C) у відповідності з заявленим способом

№ досліду	Співвідношення сировина: екстрагент	Вихід готового продукту, %	Вихід діючих речовин, %
1	1:5	18,6	38,35
2	1:9	19,1	39,55
3	1:10	20,1	40,62
4	1:11	20,0	40,55
5	1:12	20,0	40,55

Згідно з даними експерименту, ефективним інтервалом співвідношення сировини до екстрагенту є 1:9 - 1:11. При зменшенні цього співвідношення зменшується як вихід готового продукту, так і вихід діючих речовин. Збільшення співвідношення недоцільне, тому що показники виходу практично не змінюються. Оптимальним є співвідношення сировини до екстрагенту 1:10.

10

Таблиця 3

Визначення оптимального часу екстракції трави гравілату міського гарячою водою (t 95 °C) в співвідношенні сировина:екстрагент 1:10

№ досліду	Час екстракції, години	Вихід готового продукту, %	Вихід діючих речовин, %
1	1,0	18,0	37,25
2	1,5	18,2	39,25
3	2,0	20,1	40,62
4	3,0	20,0	40,62
5	4,0	20,0	40,62

Аналіз даних табл. 3 свідчить, що ефективним інтервалом часу екстракції є 1-3 годин. Зменшення цього часу не дозволяє вичерпно екстрагувати поліфенольні сполуки з сировини. Збільшення - не забезпечує зростання показників виходу готового продукту і діючих речовин, та є економічно недоцільним. Оптимальний час екстракції - 2 години.

15

Експериментальним шляхом визначено, що додаткове промивання сировини (після екстракції та зливу одержаного екстракту) екстрагентом у кількості 40 % від використаного при екстракції дозволяє збільшити відсоток екстрактивних речовин, які обумовлюють фармакологічну дію.

20

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином: траву гравілату міського подрібнюють до розміру частин 1,0-3,0 мм, принаймні трикратно екстрагують гарячою водою (t 95 °C) у співвідношенні сировина : екстрагент 1:9 - 1:11 протягом 1-3 години, сировину додатково

промивають екстрагентом, об'єднують всі зливи з подальшим упарюванням одержаного екстракту до видалення екстрагенту, фільтрацією та сушінням. Вихід готового продукту 20,1 %.

Одержаний продукт - негігроскопічний аморфний порошок світло-зеленого кольору зі специфічним характерним запахом, розчинний у воді, в 50% етанолі при нагріванні, слабо розчинний у хлороформі, етилацетаті та ефірі.

Винахід пояснюється прикладами.

Приклад 1

1,5 кг подрібнених (подрібненість 1,0-3,0 мм) трави гравілату міського - *Geum urbanum* екстрагували 10 л гарячої води з t 95 °C в типовому екстракторі ємністю 15 л з мішалкою та несправжнім дном протягом 2 годин при постійному помішуванні. Екстракт в об'ємі 5 л зливали, а сировину промивали 2 л гарячої води (t 95 °C). Екстрагування проводили за тими ж умовами тричі новими порціями екстрагенту, додаючи кожного разу 5 л гарячої води, зливаючи 5 л екстракту і промиваючи сировину 2 л гарячої води. Усі зливи об'єднували та упарювали. Об'єм кубового залишку становив 3 л. Для вилучення смолистих речовин, які випадають при упарюванні (випадає 60 г, що складає 4 % від ваги завантаженої сировини), сумарний екстракт фільтрували через нутч-фільтр. Очищений екстракт висушували у вакуумному апараті при температурі 35 ± 5 °C і розрідженні 550 ± 5 мм рт. ст. до сухого залишку. Отримали 301,5 г сухого цільового продукту, що у перерахунку на повітряно-суху сировину складає 20,1 %.

Дослідження біологічної активності суми поліфенолів, отриманої запропонованим способом, були проведені *in vitro* та *in vivo* і довели, що одержані за заявленим способом поліфенольні сполуки мають виражену антимікробну та протизапальну дію.

Приклад 2

Для вивчення антимікробної активності суми поліфенолів, одержаної заявленим способом, був використаний метод дифузії в агар. Для оцінювання активності застосовували рекомендовані ВООЗ штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Escherichia coli* 25922 ATCC, *Proteus vulgaris* 4636 ATCC, *Proteus aeruginosa* 27853 ATCC та *Candida albicans* 885/653 ATCC.

Як препарат порівняння було вибрано "Новоіманін". Результати дослідження наведені в таблиці 4.

Таблица 4

Вивчення антимікробної активності суми поліфенолів трави гравілату міського методом дифузії.

Варіант досліджу	Діаметр зон затримки мікроорганізмів в мм±мм				
	Тест-культура мікроорганізмів				
Сума поліфенолів	<i>S. aureus</i> 25923 ATCC	<i>E. coli</i> 25922 ATCC	<i>P. vulgaris</i> 4636 ATCC	<i>P. aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>C. albicans</i> 885/653 ATCC
	20,9±1,5	19,2±1,2	18,7±0,6	16,1±0,5	17,3±0,6
Новоіманін	17,1±1,3	14,3±0,5	13,5±0,8	11,4±1,2	10,3±0,9

Аналіз даних таблиці 4 свідчить про виражену антимікробну дію суми поліфенолів, отриманих з трави гравілату міського заявленим способом, що перевищує дію препарату порівняння.

Приклад 3

Протизапальну активність суми поліфенолів, одержаних заявленим способом, вивчали на моделі гострого запального набряку, викликаного субплантарним введенням у задню лапу щура 0,1 мл 1 % розчину карагеніну. Об'єм лапи вимірювали за допомогою онкометру до початку дослідження та у момент максимального розвитку набряку (4 години). Суму поліфенолів у дозі 50 мг/кг та препарат порівняння ортофен у дозі 8 мг/кг вводили у шлунок тварин відповідних дослідних груп за 30 хвилин до введення флогогенного агента. Контрольна група тварин одержувала еквівалентну кількість води. Протизапальну активність [4] розраховували за формулою:

$$A = \frac{U_k - U_0}{U_k} \times 100, \text{ де}$$

A - протизапальна активність, %

U_k і U_0 відповідно об'єм лапи у контролі та у досліді.

Результати дослідження представлені в табл. 5.

Таблиця 5

Протизапальна активність суми поліфенолів у порівнянні з ортофеном (n=7)

Показник / група	Контроль	Ортофен, 8 мг/кг	Сума поліфенолів, 50 мг/кг
Величина набряку, ум. одиниць	13,25 ±1,12	3,5 ±0,65*	6,15±0,25*/**
Протизапальна активність, %	-	73,6	53,6

Примітка.* - вірогідність розходжень при $p < 0,05$ у порівнянні з контролем.

** - вірогідність розходжень при $p < 0,05$ у порівнянні з ортофеном.

5

Таким чином, у досліді сума поліфенолів найбільшу протизапальну активність проявляла у дозі 50 мг/кг, яка викликала пригнічення розвитку експериментального набряку лап у білих щурів на 53,6 % за ступенем протизапальної активності.

10 Експериментальними дослідженнями гострої токсичності суми поліфенолів, одержаних за заявленим способом, доведено, що відповідно до класифікації К.К.Сидорова її можна віднести до практично нетоксичних речовин.

15 Таким чином, заявлено спосіб одержання суми поліфенолів з доступної сировини - трави гравілату міського з вираженою антимікробною та протизапальною активністю. Спосіб може бути здійснений у промислових умовах фармацевтичного підприємства на стандартному обладнанні. Одержаний за заявленим способом продукт відзначається широким спектром фармакологічної дії, нетоксичний, не алергійний, стійкий при зберіганні (термін зберігання 3 роки) і може бути використаний як субстанція для створення лікарських препаратів у різних лікарських формах.

Джерела інформації

20 1. Деклараційний патент 69362A, Україна, МПК7 А61К 35/78. Спосіб одержання комплексу поліфенольних сполук з протизапальною, кардіопротекторною та антиоксидантною дією. Заявка 2003109473, заявл. 21.10.2003, опубл. 15.09.2004, Бюл. № 9.

25 2. Патент 76063, Україна А 61К36/185. Спосіб одержання суми поліфенолів з антимікробною, протизапальною та діуретичною активністю. Заявка 200500114, заявл. 04.01.2005, опубл. 15.06.2006, Бюл. № 6.

3. Деклараційний патент 59681 А, Україна, МПК7 А61К 35/78. Спосіб одержання поліфенольного комплексу «Флавітін» з протизапальною, анальгетичною, противиразковою та антиоксидантною дією. Заявка 2002119121, заявл. 15.11.2002, опубл. 15.09.2003, Бюл. № 9.

30 4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод, рек. / за ред. О. В.Стефанова. - К.: Авіцена, 2001. - 528 с

5. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / відп. ред. А.М.Гродзінський. К.: Вид-во «Українська Радянська Енциклопедія» ім. М.П.Бажана, 1992. - С 276-277.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

35

Спосіб одержання суми поліфенолів шляхом екстракції рослинної сировини з подальшим упарюванням, фільтрацією та сушінням об'єднаного екстракту, який **відрізняється** тим, що екстракції піддають траву гравілату міського (*Geum urbanum*), як екстрагент використовують гарячу воду температурою 95 °С при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:10 протягом 2-х годин, після чого сировину додатково промивають екстрагентом у кількості до 40 % від заданого співвідношення, а зливи об'єднують з сумарним екстрактом.

40

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601