



УКРАЇНА

(19) UA (11) 19508 (13) U  
(51) МПК  
A61K 36/20 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ РІДКОГО ЕКСТРАКТУ З АНТИМІКРОБНОЮ ТА ПРОТИГРИБКОВОЮ АКТИВНІСТЮ

1

(21) u200607327

(22) 03.07.2006

(24) 15.12.2006

(46) 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.

(72) Рехлецька Олена Володимирівна, Калинюк Тимофій Григорович, Ващенко Катерина Фролівна, Бензель Леонід Васильович, Вольбин Світлана Володимирівна

(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

(57) 1. Спосіб одержання рідкого екстракту з антимікробною та протигрибковою активністю, що включає використання висушених бруньок берези бородавчастої та їх екстрагування, який **відрізня-**

2

**ється** тим, що проводять поділ сировини, що використовують, на три частини, багаторатне екстрагування кожної частини сировини екстрагентом або екстрагування наступної частини сировини відпуском, отриманим перколяцією попередньої порції сировини, та очистку одержаного рідкого екстракту від супутніх речовин.

2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що як екстрагент використовують спирт етиловий у концентрації 60-70%.

3. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що очистку отриманого рідкого екстракту від супутніх речовин здійснюють відстоюванням при температурі 8°C не менше 2 діб та наступним фільтруванням.

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме - фармації, і може бути використана при створенні лікарського засобу з антимікробною та протигрибковою активністю для лікування гострих і хронічних інфекційних захворювань шкіри, поліетіологічних дерматологічних захворювань з інфекційною компонентою (вугрова хвороба, екземи, дерматити), кандидозів, що є особливо актуальним в умовах високої резистентності мікроорганізмів до традиційної антибіотикотерапії.

У науковій літературі описано екстракт, одержаний з бруньок берези бородавчастої, який є активним щодо колекційних і клінічних штамів стафілококів [1].

Відомий спосіб одержання такого засобу, основні умови виконання якого включають екстрагування висушених бруньок берези 90% спиртом етиловим при кімнатній температурі протягом 2 тижнів (співвідношення сировина/екстрагент 1:10). Цей фітозасіб умовно позначили шифром Б-90 [1].

Недоліком даного способу є те, що рідкий екстракт одержується методом настоювання (мацерації), який є статичним і не дозволяє повністю екстрагувати біологічно активні речовини із сировини. Довга тривалість екстрагування (2 тижні) призводить до забруднення витяжки супутніми високомолекулярними сполуками, швидкість дифузії яких менша, ніж у біологічно активних речо-

вин; при тривалому екстрагуванні також починають відбуватися небажані процеси розкладу під впливом ферментів. Використання як екстрагента спирту етилового у концентрації 90% не дозволяє достатньо мірою екстрагувати водорозчинні сполуки (флавоноїди у формі глікозидів, органічні кислоти, дубильні речовини), які забезпечують комплексну дію екстракту. Спирт етиловий у концентрації 90% дубить шкіру, що перешкоджає проникненню діючих речовин; спирт у високій концентрації (90%) є дорожчим екстрагентом, ніж у нижчих концентраціях (60-70%).

В основу корисної моделі поставлено завдання одержати лікарський засіб з антимікробною та протигрибковою активністю, який завдяки застосуванню оптимального екстрагента та раціонального методу екстрагування містить комплекс біологічно активних речовин, максимально вилучених із рослинної сировини.

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі одержання рідкого екстракту з антимікробною та протигрибковою активністю, що включає використання висушених бруньок берези бородавчастої та їх екстрагування, згідно з корисною моделлю проводять поділ сировини, що використовується, на три частини, багаторатне екстрагування кожної частини сировини екстрагентом або екстрагування наступної частини сирови-

(19) UA (11) 19508 (13) U

ни відпуском, одержаним перколяцією попередньої порції сировини, та очистку одержаного рідкого екстракту від супутніх речовин.

Поставлене завдання вирішується ще тим, що як екстрагент використовують спирт етиловий у концентрації 60-70%.

Поставлене завдання вирішується ще тим, що очистку одержаного рідкого екстракту від супутніх речовин здійснюють відстоюванням при температурі 8°C не менше 2 діб та наступним фільтруванням.

Удосконалений спосіб екстрагування бруньок берези бородавчастої приводить до одержання кінцевого продукту з вищим виходом флавоноїдів як активно діючих речовин. Одержаний рідкий екстракт володіє високою активністю не тільки щодо патогенних і умовно-патогенних штамів стафілококів та стрептококів, але активний і щодо грибової флори, а саме - *Candida albicans*, розвиток якої є частим ускладненням антимікробної терапії. Використання в якості екстрагента спирту етилового у концентрації 60-70% значно здешевлює виробництво рідкого екстракту.

Запропонований спосіб здійснюють наступним чином.

Бруньки берези бородавчастої (*Betula verrucosa* Ehrh.), попередньо висушені, ділять на три частини і завантажують у три перколятори. Сировину у першому перколяторі заливають спиртом етиловим відповідної концентрації "до дзеркала" і настоюють протягом 2год, потім проводять перколяцію. У другий перколятор подають свіжий екстрагент або відпуск, одержаний після настоювання сировини в першому перколяторі, "до дзеркала" та проводять настоювання протягом 2год. У третій перколятор подають свіжий екстрагент або відпуск, одержаний після настоювання сировини в другому перколяторі, "до дзеркала" та проводять настоювання протягом 2год.

Три порції готового продукту об'єднують і одержують рідкий екстракт з бруньок берези бородавчастої. Одержаний рідкий екстракт відстоюють при температурі 8°C не менше 2 діб, після чого фільтрують під тиском.

Одержаний екстракт являє собою прозору рідину світло-коричневого кольору з приємним характерним запахом. Вихід кінцевого продукту становить 97,7-98,5%; сумарний вміст флавоноїдів в перерахунку на гіперозид становить 1,20%-1,94%. Рідкий екстракт бруньок берези умовно позначений шифром "ББ".

Спосіб ілюструється наступними прикладами.

#### Приклад 1

Бруньки берези бородавчастої (*Betula verrucosa* Ehrh.), попередньо висушені, ділять на три рівні частини по 30,0г і завантажують у три перколятори. Кількість екстрагента, розрахована з урахуванням маси сировини та коефіцієнта спиртопоглинання, становить 315мл. Сировину у першому перколяторі заливають спиртом етиловим 70% "до дзеркала" і настоюють протягом 2 год. Через 2год проводять перколяцію і одержану витяжку переносять у другий перколятор. У перший перколятор знову подають свіжий екстрагент "до дзеркала". Сировину в обох перколяторах настоюють протягом 2год. Після цього витяжку, одержану

ну із другого перколятора, переносять на сировину в третій перколятор, а в другий - переносять витяжку, одержану з першого перколятора. У перший перколятор втретє подають свіжий екстрагент, що залишився. Завантажені перколятори залишають для настоювання протягом 24год.

Через добу з третього перколятора отримують витяжку, яка є готовим продуктом. Витяжку, одержану з другого перколятора, переносять у третій перколятор. З першого перколятора одержують витяжку, сировину забирають і відтискають. Витяжку та відтиск з першого перколятора використовують для настоювання сировини в другому перколяторі. Обидва перколятори залишають на 2год.

За 2 год з третього перколятора одержують другу порцію готового продукту. З другого перколятора одержують витяжку, сировину забирають і відтискають. Ці вилучення переносять у третій перколятор, де їх настоюють з сировиною протягом 2 год. За 2год одержують третю порцію готового продукту, до якої долучають відтиск із сировини. Три порції готового продукту об'єднують і одержують рідкий екстракт з бруньок берези бородавчастої. Вихід кінцевого продукту, умовно позначеного шифром ББ-1, становить 98,4%; сумарний вміст флавоноїдів в перерахунку на гіперозид становить 1,94%±0,18%.

#### Приклад 2

Бруньки берези бородавчастої (*Betula verrucosa* Ehrh.), попередньо висушені, ділять на три рівні частини по 30,0г і завантажують у три перколятори. Кількість екстрагента, розрахована з урахуванням маси сировини та коефіцієнта спиртопоглинання, становить 315мл. Сировину у першому перколяторі заливають спиртом етиловим 65% "до дзеркала" і настоюють протягом 2 год. Через 2год проводять перколяцію і одержану витяжку переносять у другий перколятор. У перший перколятор знову подають свіжий екстрагент "до дзеркала". Сировину в обох перколяторах настоюють протягом 2год. Після цього витяжку, одержану із другого перколятора, переносять на сировину в третій перколятор, а в другий - переносять витяжку, одержану з першого перколятора. У перший перколятор втретє подають свіжий екстрагент, що залишився. Завантажені перколятори залишають для настоювання протягом 24год.

Через добу з третього перколятора отримують витяжку, яка є готовим продуктом. Витяжку, одержану з другого перколятора, переносять у третій перколятор. З першого перколятора одержують витяжку, сировину забирають і відтискають. Витяжку та відтиск з першого перколятора використовують для настоювання сировини в другому перколяторі. Обидва перколятори залишають на 2год.

За 2год з третього перколятора одержують другу порцію готового продукту. З другого перколятора одержують витяжку, сировину забирають і відтискають. Ці вилучення переносять у третій перколятор, де їх настоюють з сировиною протягом 2 год. За 2год одержують третю порцію готового продукту, до якої долучають відтиск із сировини. Три порції готового продукту об'єднують і одержують рідкий екстракт з бруньок берези бородавчастої. Вихід кінцевого продукту, умовно позначеного шифром ББ-2, становить 97,9%; сумарний вміст

флавоноїдів в перерахунку на гіперозид становить  $1,32\pm 0,20\%$ .

#### Приклад 3

Бруньки берези бородавчастої (*Betula verrucosa* Ehrh.), попередньо висушені, ділять на три рівні частини по 30,0г і завантажують у три перколятори. Кількість екстрагента, розрахована з урахуванням маси сировини та коефіцієнта спиртопоглинання, становить 315мл. Сировину у першому перколяторі заливають спиртом етиловим 60% "до дзеркала" і настоюють протягом 2год. Через 2год проводять перколяцію і одержану витяжку переносять у другий перколятор. У перший перколятор знову подають свіжий екстрагент "до дзеркала". Сировину в обох перколяторах настоюють протягом 2год. Після цього витяжку, одержану із другого перколятора, переносять на сировину в третій перколятор, а в другий - переносять витяжку, одержану з першого перколятора. У перший перколятор втретє подають свіжий екстрагент, що залишився. Завантажені перколятори залишають для настоювання протягом 24год.

Через добу з третього перколятора отримують витяжку, яка є готовим продуктом. Витяжку, одержану з другого перколятора, переносять у третій перколятор. З першого перколятора одержують витяжку, сировину забирають і відтискають. Витяжку та відтиск з першого перколятора використовують для настоювання сировини в другому перколяторі. Обидва перколятори залишають на 2год.

За 2год з третього перколятора одержують другу порцію готового продукту. З другого перколятора одержують витяжку, сировину забирають і відтискають. Ці вилучення переносять у третій перколятор, де настоюють їх з сировиною протягом 2 год. За 2год одержують третю порцію готового продукту, до якої долучають відтиск із сировини. Три порції готового продукту об'єднують і одержують рідкий екстракт з бруньок берези бородавчастої. Вихід кінцевого продукту, умовно позначеного шифром ББ-3, становить 98,2%; сумарний вміст флавоноїдів в перерахунку на гіперозид становить  $1,20\pm 0,19\%$ .

Антимікробну активність одержаних рідких екстрактів вивчали *in vitro* методом дифузії в агар (метод двошарового висівання) [2]. Досліди ставили у триразовому паралельному відтворенні. Як тест-культури використовували штами мікроорганізмів, рекомендовані ВООЗ та Державною Фар-

макопеею України (Розділ 2.6. Біологічні випробування): *Staphylococcus aureus* - 6538 ATCC, *Staphylococcus epidermidis* - 14990 ATCC, *Streptococcus faecalis* - 1783, *Candida albicans* - 10231 ATCC [3, 4].

У чашки Петрі діаметром 9см вносили 10мл розплавленого густого живильного середовища для вирощування бактерій (м'ясо-пептонний агар - для *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Sir. faecalis*) або розплавленого густого живильного середовища для вирощування грибів (середовище Сабуро - для *Candida albicans*) із температурою близько 45°C і давали середовищу застигнути. Культури досліджуваних тест-штамів вирощували на відповідному середовищі (м'ясо-пептонний агар - для *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Sir. faecalis*, середовище Сабуро - для *Candida albicans*) протягом 18-24 год, після чого готували завис мікроорганізмів за оптичним стандартом мутності 5 одиниць.

1мл завису, підготованого як описано вище, вносили у пробірку, що містила 10мл розплавленого і охолодженого до температури не більше 45°C відповідного густого живильного середовища. Швидко перемішували вміст пробірки і переносили у чашку Петрі, підготовану, як описано вище, що містила відповідне густе живильне середовище. Швидким погойдуванням чашки Петрі рівномірно розподіляли верхній шар живильного середовища. Після застигання середовища у верхньому шарі спеціальним пробійником виготовляли лунки, в які стерильною мікропіпеткою вносили досліджувані об'єкти. Для виключення впливу екстрагенту на ріст тест-культур в контрольні лунки вносили 60%, 65% та 70% спирт етиловий.

Чашки перевертали й інкубували протягом 24-48 годин при температурі 37°C - *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Str. faecalis*, при температурі 22°C - *Candida albicans*.

Після інкубації в термостаті за допомогою лупи з окуляр-мікрометром оцінювали діаметри зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунок.

Для порівняльної характеристики і оцінки активності досліджуваних варіантів засобу ББ в якості прототипу за способом одержання та характером дії використовували згаданий вище засіб Б-90 [1]. Результати вивчення антимікробної та протигрибкової активності засобів серії ББ та Б-90 представлені у таблиці.

Таблиця.

Порівняльна оцінка антимікробної та протигрибкової активності засобів серії ББ та Б-90

Тест-штами мікроорганізмів	Зони затримки росту мікроорганізмів, мм			
	Б-90 (прототип)	ББ-1	ББ-2	ББ-3
<i>S. aureus</i>	12,89±0,71	13,67±0,97	11,67±0,97	8,67±0,97
<i>S. epidermidis</i>	не досліджували	19,67±0,97	16,33±0,97	11,33±0,97
<i>Sir. faecalis</i>	не досліджували	11,67±0,97	9,33±0,97	6,67±0,97
<i>Candida albicans</i>	не досліджували	14,67±0,97	10,33±0,97	8,33±0,97

Як видно з даних таблиці, рослинні екстракти ББ-1, ББ-2, ББ-3 пригнічують ріст мікроорганізмів *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Sir. faecalis*, *Candida albicans*. Оскільки при внесенні в контрольні лунки

спирту етилового різної концентрації спостерігалося дуже слабе пригнічення росту мікроорганізмів - діаметр зон затримки росту не перевищував 4,33±0,27мм - можна виключити вплив екстрагенту

на ріст тест-культур. Найвищу активність щодо всіх досліджуваних штамів мікроорганізмів проявляє рідкий екстракт, умовно позначений шифром ББ-1. У порівнянні з прототипом, умовно позначеним Б-90, активність засобу ББ-1 щодо штаму *S.aureus* є вищою.

Таким чином, проведені дослідження свідчать, що представлений удосконалений спосіб одержання рідкого екстракту дозволяє отримати рідкий екстракт з високим вмістом флавоноїдів як активно діючих речовин, який володіє вищою антимікробною активністю по відношенню до *S. aureus*, ніж його порівняльний зразок - засіб Б-90. Окрім того, одержаний рідкий екстракт володіє високою активністю щодо штаму *S. epidermidis*, а також значною активністю щодо штаму *Sir. faecalis* та щодо дріжджового грибка *Candida albicans*. Вказані властивості нових рослинних екстрактів дозволяють пропонувати вищезгаданий спосіб для одержання ефективного антимікробного та протигриб-

кового засобу для лікування багатьох дерматологічних захворювань.

Джерела інформації:

1. Куцик Р.В. Скринінгове дослідження проти-мікробної активності лікарських рослин Прикарпаття відносно поліантибіотикорезистентних клінічних штамів стафілококів. Повідомлення 2. // Галицький лік. вісник. -2005.-Т.12.-Х23.-С.52-58.

2. Методы определения чувствительности, устойчивости и толерантности микроорганизмов к антибиотикам, химиотерапевтическим препаратам. / Под ред. А.И.Корнищенко. - СПб: Интермедика, 1999. - 336с.

3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-е вид. - Харків: РІПЕГ, 2001.- 556с.

4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-е вид. - Харків: РІПЕГ, 2001.- Додаток 1. - 2004. - 520с.