



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 56771

(13) A

(51) 7 A61K35/78

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ПРОТИМІКРОБНОГО, КРОВОСПИННОГО ТА ЦИТОТОКСИЧНОГО ЗАСОБУ

1

2

(21) 2002097205

(22) 05 09 2002

(24) 15 05 2003

(46) 15 05 2003, Бюл. № 5, 2003 р.

(72) Хворост Ольга Павлівна, Гречін Павло Вікторович, Мироненко Людмила Григорівна, Гладух Євген Володимирович, Сербін Анатолій Гаврилович, Маркова Віра Михайлівна, Малоштан Людмила Миколаївна, Ждамарова Лариса Анатоліївна

(73) НАЦІОНАЛЬНА ФАРМАЦЕВТИЧНА АКАДЕМІЯ УКРАЇНИ

(57) Спосіб одержання протимікробного, кровоспинного та цитотоксичного засобу шляхом екстракції подрібненої рослинної сировини з надземної частини рослин роду вільха 70 %-ним етанолом з наступною фільтрацією та упарюванням, який відрізняється тим, що як рослинну сировину використовують кору рослин роду вільха, сировину знежирюють хлороформом, одержаний шрот піддають екстракції етанолом методом дрібномацерації при загальному співвідношенні сировина-екстрагент 1 10-1 15

Винахід відноситься до фармацевтичної, а саме до способів одержання біологічно активних засобів з рослинної сировини, зокрема протимікробного та кровоспинного засобу з кори рослин роду вільха, що може бути використаний у якості лікарського засобу зазначеної фармакологічної активності, виконаного у формі рідкого, густого або сухого екстракту, таблеток, мазей, супозиторіїв, гелей, аерозолів тощо

Відомий спосіб одержання ранозагоюючого та антимікробного способу (Пат. 2152797, РФ 7 А61Р17/02, Заявл. 02.06.99р., Опубл. 20.07.2000 р. Бюл. №20) В якості сировини при здійсненні способу використовують листя горіху волоського, яке попередньо замочують у 35 - 45%-вому спирті етиловому (1 : 1) протягом 2 годин, потім тричі проводять екстракцію 35 - 45%-вим спиртом етиловим методом настоювання при загальному співвідношенні сировина-екстрагент 1 : 5 Одержані екстракти об'єднують, настоюють протягом трьох діб при 6 - 10°C, фільтрують і при необхідності концентрують до одержання густого або сухого екстракту

Проте зазначений спосіб відзначається тривалістю здійснення, одержаний екстракт має вузько спрямовану фармакологічну дію, причому вихід по сухому залишку становить лише 6 - 10% від ваги сировини

Відомий також спосіб одержання суми поліфенолів з суцільної вільхи клейкої (Пат. 16618, Україна, А61К35/78, Заявл. 22.07.85, Опубл. 29.07.97, Бюл.

№4), який передбачає дрібну екстракцію подрібненої сировини 70%-вим етанолом протягом 12 годин при співвідношенні сировина-екстрагент 1 : 6 - 1 : 8 Упарений екстракт фільтрують, обробляють етилацетатом у співвідношенні 1 : 1 - 1 : 1,5 та упарюють ефірний витяг до сухого залишку Вихід готового продукту становить 3,5 - 7%

Сума поліфенолів з суцільної вільхи клейкої, яку містить одержаний за зазначеним способом екстракт, складається головним чином з похідних елагової кислоти - елаготанінів Екстракт має кровоспинну, протизапальну та антимікробну дію Проте одержаний за даним способом сухий екстракт містить залишкову кількість токсичної речовини - етилацетату, який іноклюдється частками сухого екстракту Вихід цільового продукту складає лише 7%

Задачею винаходу є створення способу одержання протимікробного, кровоспинного та цитотоксичного засобу шляхом здійснення визначеної послідовності технологічних операцій при дотриманні заданих режимів, які забезпечують здійснення способу у промислових умовах, одержання високого виходу цільового продукту при скороченні часу проведення процесу, при цьому одержують засіб з вираженим спектром фармакологічної дії, зокрема протимікробної, кровоспинної та цитотоксичної, який може бути використаний у практичній медицині у формі рідкого, густого або сухого екстракту, таблеток, мазей, супозиторіїв, гелей, аерозолів тощо

(13) A

(11) 56771

(19) UA

Задача вирішується таким чином, що у способі одержання протимікробного, кровоспинного та цитотоксичного засобу шляхом екстракції подрібненої рослинної сировини з надземної частини рослин роду вільха 70%-вим етанолом з наступною фільтрацією та упарюванням, згідно з винаходом передбачено, що у якості рослинної сировини використовують кору рослин роду вільха, сировину знежирюють хлороформом, одержаний шрот піддають екстракції етанолом методом дробної мацерації при загальному співвідношенні сировина-екстрагент 1 : 10 - 1 : 15. Вихід цільового продукту складає 17 - 24% від ваги сировини.

Технологічні операції та режими здійснення заявленого способу визначені експериментальним шляхом.

Знежирення рослинної сировини проводили для видалення ліпофільного комплексу. Експериментально доведено, що спектр біологічної активності засобу за заявленим способом обумовлений фенольними сполуками, які не екстрагуються хлороформом. Крім того, при цьому покращуються умови проведення подальших технологічних стадій - упарювання до густої або сухої консистенції. Екстракція ліпофільних сполук проводиться малими дозами хлороформу, що суттєво не впливає на вартість цільового продукту. Ліпофільна фракція кори рослин роду вільхи містить значні кількості високомолекулярних сполук - стеринів, жирних кислот тощо. Ці сполуки заважають процесу концентрації витягу до густого або сухого стану, провокуючи утворення піни та подовжують термін упарювання до сухого стану, додаючи ще технологічні труднощі у виборі умов сушіння.

Хлороформ використовували як знежирюючий агент тому, що він традиційно використовується в промислових умовах як знежирювач, належить до найбільш ефективних розчинників, що спроможні екстрагувати ліпофільні сполуки. Крім того, він належить до пожежебезпечних реагентів, бо є негорючим, та має досить невелику вартість, що важливо для рентабельності виробництва.

Спирт етиловий був вибраний тому, що він здатний вичерпно екстрагувати комплекс фенольних сполук з кори вільхи, крім того, він належить до найширше використовуваних в фітохімічних виробництвах екстрагентів, 70%-ва концентрація вибрана експериментальним шляхом. Дані експерименту приведені в табл. 1. Кора рослин роду вільха, наприклад, вільхи клейкої або вільхи сірої містить значні кількості фенольних сполук, а саме гідролізуємих танінів та катехинів. Виходячи з цього контроль ефективності розчинника різних концентрацій оцінювали за критеріями вмісту екстрактивних речовин та вмісту фенольних сполук (перманганатометричний метод ДФ XI видання - метод Левенталя-Нейбауера). За даними табл. 1 використання в якості екстрагента спирту етилового 70%-вої концентрації найоптимальніше з точки зору вмісту як екстрактивних так і фенольних сполук.

Таблиця 1

Вміст екстрактивних та фенольних сполук в екстрактах з кори вільхи клейкої, отриманих за допомогою різних екстрагентів

№ п/п	Екстрагент	Вміст сполук в перерахунку на повітряно-суху сировину, %	
		екстрактивних	фенольних
1	Вода	16,93	14,84
2	30%-вий етанол	15,63	12,47
3	50%-вий етанол	18,25	14,15
4	70%-вий етанол	22,75	17,56
5	96%-вий етанол	12,38	9,34

Примітка: результати є середніми 5-х визначень.

Співвідношення сировина - екстрагент було теж вибрано експериментальним шляхом. Вміст екстрактивних та фенольних сполук в екстрактах при різному співвідношенні сировина-екстрагент приведені в табл. 2.

Таблиця 2

Вміст екстрактивних та фенольних сполук в екстрактах з кори вільхи клейкої, що отримані за допомогою 70%-вого етанолу при різному співвідношенні сировина-екстрагент

№ п/п	Співвідношення сировина-екстрагент	Вміст сполук в перерахунку на повітряно-суху сировину, %	
		екстрактивних	фенольних
1	1 : 5	12,45	8,25
2	1 : 10	17,6	12,35
3	1 : 15	24,04	19,62
4	1 : 20	24,97	19,78

Дані таблиці свідчать, що оптимальним є співвідношення сировина - екстрагент 1 : 10 - 1 : 15. Зменшення співвідношення призводить до різкого зниження вмісту як екстрактивних так і фенольних сполук в екстракті, а збільшення співвідношення економічно недоцільне з-за незначного збільшення вмісту вищезгаданих груп речовин.

Фільтрування необхідне для запобігання можливої присутності в кінцевому продукті часток подрібненої сировини.

Заявлений спосіб може включати при необхідності стадію упарювання для отримання крім рідкої інших консистенцій кінцевого продукту - густого або сухого екстракту. Це дає більший простір маневрування в технологічному аспекті - при створенні ряду лікарських форм, таких, як супозиторії, гелі, таблетки тощо. Використання густого та сухого екстракту дозволить запобігти таким незручностям як неточність дозування, наявність етанолу та ін.

Спосіб здійснюється таким чином. Подрібнену

до розміру часток 0,5 - 3мм кору рослин роду вільха заливають хлороформом, отриманий хлороформний екстракт зливають, для більш повного видалення ліпофільної фракції сировину обробляють ще двічі порціями хлороформу. Шрот видаляють з екстрактора, висушують на повітрі до видалення парів хлороформу. Знежирений шрот завантажують в екстрактор, заливають 70%-вим етанолом до дзеркала, екстрагують протягом 12 годин, екстракт зливають в прийомник. Екстракцію проводять ще двічі. Отримані екстракти (загальне співвідношення сировина - екстрагент 1 : 10 - 1 : 15) об'єднують. При необхідності фільтрують. При необхідності упарюють до густого або сухого екстрактів.

Вихід цільового продукту складає 17 - 24% від повтряно-сухої ваги сировини.

Спосіб ілюструється конкретними прикладами.

Приклад 1. 5кг подрібненої до розміру часток 0,5мм кори вільхи клейкої заливають 5л хлороформу, через 6 годин отриманий хлороформний екстракт зливають, сировину обробляють ще двічі порціями хлороформу по 5л. Шрот видаляють з екстрактора висушують на повітрі до видалення парів хлороформу. Знежирений шрот завантажують в екстрактор, заливають 20л 70%-вого спирту етилового, екстрагують протягом 12 годин, екстракт зливають в прийомник. Екстракцію проводять ще двічі порціями по 15л 70%-вого спирту етилового. Отримані екстракти (загальне співвідношення сировина - екстрагент 1 : 10) в обсязі 47л об'єднують. При необхідності фільтрують.

Вихід цільового продукту складає 17,6% від повтряно-сухої ваги сировини.

Приклад 2. 5кг подрібненої до розміру часток 1мм кори вільхи сірої заливають 5л хлороформу, через 6 годин отриманий хлороформний екстракт зливають, сировину обробляють ще двічі порціями хлороформу по 5л. Шрот видаляють з екстрактора висушують на повітрі до видалення парів хлороформу. Знежирений шрот завантажують в екстрактор, заливають 23л 70%-вого спирту етилового, екстрагують протягом 12 годин, екстракт зливають в прийомник. Екстракцію проводять аналогічно двічі порціями по 20л 70%-вого спирту етилового. Отримані екстракти (загальне співвідношення сировина - екстрагент 1 : 12) в обсязі 60л об'єднують. При необхідності фільтрують і концентрують до густої консистенції (вологість 15%).

Вихід цільового продукту складає 21,8% від ваги повтряно-сухої сировини.

Приклад 3. 5кг подрібненої до розміру часток 3мм кори вільхи клейкої заливають 5л хлороформу, через 6 годин отриманий хлороформний екстракт зливають, сировину обробляють ще двічі порціями хлороформу по 5л. Шрот видаляють з екстрактора висушують на повітрі до видалення парів хлороформу. Знежирений шрот завантажують в екстрактор, заливають 25л 70%-вого спирту етилового, екстрагують протягом 12 годин, екстракт зливають в прийомник. Екстракцію проводять

ще двічі порціями по 25л 70%-вого спирту етилового. Отримані екстракти (загальне співвідношення сировина - екстрагент 1 : 15) в обсязі 72л об'єднують. При необхідності фільтрують, концентрують в вакуумі до густої консистенції. Після цього сушать в вакуум-сушильній шафі або сушарці до сухого залишку.

Вихід цільового продукту складає 24,0% від ваги сировини.

Приклад 4. Біологічну активність засобу, одержаного заявленим способом, визначали наступним чином.

Кровоспинну активність розглядали як гемостатичну при визначенні швидкості згортання крові за Альгаузеном. Нормальні показники швидкості згортання крові при застосуванні даного методу складають 5 - 6хв при кімнатній температурі.

Час згортання крові визначають за допомогою секундоміру, результати приведені в табл 3.

Таблиця 3

Порівняльне вивчення швидкості згортання крові під дією густого та сухого екстрактів кори вільхи клейкої

№ п/п	Назва вивчаємої сполуки	Час, секунди
1	Контроль	180
2	Амінокапронова кислота (гемостатик)	118
3	Густий екстракт кори вільхи клейкої (0,25мг/кг)	103
4	Сухий екстракт кори вільхи клейкої (0,25мг/кг)	114

Аналіз результатів експериментів свідчить, що густий та сухий екстракт кори вільхи клейкої проявляє гемостатичний ефект, який можна співставити з гемостатичним ефектом амінокапронової кислоти.

Для оцінки цитотоксичної дії був використаний модифікований метод Шрека. Суть цього методу полягає в тому, що при суправітальному фарбуванні 1% водним розчином метиленового синього живі клітини кісткового мозку не пропускають барвник, в той час як мембрана пошкоджених клітин фіксує забарвлення.

Для визначення цитотоксичної дії екстрактів у пробірки вносили по 0,125мл клітинної зависі (з концентрацією 24×10^4 кліток в мл⁻³) і 0,125мл 2% розчину. Контролем служили серії з додаванням 0,125мл фізіологічного розчину. Час експозиції становив 15 хвилин. Була використана модель, на фоні якої тестувалися наступні препарати: есенціал, сіл і бор, густий екстракт з кори вільхи клейкої. Вказані препарати вносилися у пробірки в аналогічних дозах і об'ємах (табл 4). Отримані дані наведені в табл 4.

Таблиця 4

Вплив вивчаємих екстрактів
на клітини кісткового мозку (n = 5)

Речовини (2% розчини з розведенням 1/8)	Кількість жи- вих клітин, %	Токсичність, %
контроль	98	2
ессенціале	50	50
силібор	26	74
густий екстракт	14	86

Отримані результати переконливо доводять цитотоксичний ефект на клітини кісткового мозку для густого екстракту з кори вільхи клейкої. В даній комбінації найбільш активним виявився густий екстракт з кори вільхи, що дозволяє передбачити його дію при злоякісних новоутвореннях.

Приклад 5. Протимікробну активність отриманої субстанції вивчали за методом дифузії в агар (метод "колодязів") з використанням двохшарової заливки чашок. Як тест-культури використовували різні музейні та клінічні штами бактерій та грибів: *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 885-653. Музейні штами одержані з Державного інституту стандартизації культур ім. Л. А. Тарасевича (Москва) та інституту мікробіології ім. Л. Пастера (Санкт-Петербург). Результати приведені в табл. 5.

Таблиця 5

Протимікробна активність отриманої субстанції з кори вільхи клейкої в порівнянні з прототипом - густим екстрактом листків волоського горіха

Тест-штами	Діаметр затримки росту мікроорганізмів, мм	
	Густий екстракт кори вільхи клейкої	70% спирт
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	20,2	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,7	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14,3	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	14,0	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	13,3	-

Примітка 1) "-" - діаметр затримки росту мікроорганізмів менш ніж 10 мм, 2 - дані є середніми значеннями 5-х визначень.

З даних табл. 5 витікає, що густий екстракт кори вільхи клейкої має досить широкий спектр протимікробної активності, в відношенні грампозитивних та грам негативних мікроорганізмів (крім спороутворюючої культури *Bacillus subtilis*). Найбільш виражений ефект густий екстракт кори вільхи мав в відношенні культур *Staphylococcus aureus* та *Corynebacterium diphtheriae*.

Крім того, протимікробна активність до кориневобактерії дифтерії була визначена на 54-ох штаммах дифтерійної палички. Токсигенні штами склалися з 42 культур біоваріанту *gravis* та 12 культур біоваріанту *mitis*. Всі штами виділені від хворих на дифтерію та носіїв кориневобактерії за період епідемії 1991 - 1998 рр. у Харківській області. Результати приведені в табл. 6. З даних табл. 6 видно, що густий екстракт з кори вільхи клейкої в розчинах в концентраціях 1% та 2% має виражену антимікробну дію в відношенні різних штамів кориневобактерії, що може мати значення при створенні лікувальних та профілактичних антидифтерійних засобів.

Таблиця 6

Протимікробна активність отриманої субстанції (густого екстракту) з кори вільхи клейкої відносно кориневобактерії дифтерії

Концентрація розчину суб- станції, %	Діаметр зон затримки росту <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (мм), біоваріанту			
	Gravis		Mitis	
	n	X ± m	n	X ± m
0,25	32	6,47 ± 1,85	10	12,0 ± 3,28
0,5	42	11,69 ± 1,74	12	15,67 ± 3,38
1,0	38	17,90 ± 1,42	11	21,67 ± 1,44
2,0	16	24,26 ± 0,57	9	22,13 ± 1,75

Даний спосіб промислово здійснюваний, не потребує спеціального обладнання, не створює додаткових труднощів у реалізації, здійснюється за досить короткий час, зумовлює високий вихід кінцевого продукту з біологічною активністю (протимікробна, кровоспинна, цитотоксична дія), що може застосовуватися в фармації та медичній практиці при лікуванні інфекційних уражень шкіри та слизових оболонок, що супроводжуються виразками та кровотечами. Спосіб дозволяє одержувати ефективний лікарський засіб у формі рідких, густих та сухих екстрактів, мазей, гелів, супозиторіїв, таблеток тощо.