



УКРАЇНА

(19) UA (11) 79873 (13) C2

(51) МПК

A61K 36/63 (2007.01)

A61P 31/04 (2007.01)

A61P 31/10 (2007.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ КОМПЛЕКСУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З ПРОТИМІКРОБНОЮ ТА
МЕМБРАНОСТАБІЛІЗУВАЛЬНОЮ ДІЄЮ

1

(21) a200509622

(22) 13.10.2005

(24) 25.07.2007

(46) 25.07.2007, Бюл. №11, 2007р.

(72) Кічимасова Яна Сергіївна, Хворост Ольга Павлівна, Маркова Віра Михайлівна, Малоштан Людмила Миколаївна, Малий Володимир Валентинович

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(56) UA 16618 A1, 29.08.1997

UA 56771 A, 15.05.2003

SU 1312777 A1, 27.03.1996

SU 1819618 A1, 07.06.1993

RU 2238747 C2, 27.10.2004

RU 2240814 C1, 27.11.2004

2

MD 0000405 C2, 31.07.1994

Milanovic Dragan, Veljkovic Vlada B., Todorovic Branimir, Stankovic Miomir / Analiza ekstrakcije rezinoida kantariona (*Hypericum perforatum* L.). I. Efikasnost i optimizacija ekstrakcije// Hem. ind.-2002.- 56.- N 2.- C.54-59(57) Спосіб отримання комплексу біологічно активних речовин з протимікробною та мембраностабілізуючою дією шляхом дрібної екстракції подрібненої рослинної сировини 70% спиртом етиловим з наступною фільтрацією та упарюванням одержаного сумарного екстракту, який **відрізняється** тим, що як сировину використовують листя ясен звичайного, а екстракцію проводять при температурі близько 90°C при співвідношенні сировини та екстрагенту 1:15-1:20.

Винахід відноситься до хіміко-фармацевтичної промисловості, а саме до способів отримання з рослинної сировини біологічно активних речовин та їх комплексів з протимікробною та мембраностабілізуючою дією.

Проблема створення препаратів вищезазначених видів дії достатньо гостро стоїть перед вітчизняною охороною здоров'я, в зв'язку з чим пошук нових джерел біологічно активних речовин є актуальним завданням.

Відомий спосіб одержання суми поліфенолів з суплідь вільхи клейкої [Пат. 16618, Україна, МПК 4 A61K35/78, 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 суплідь вільхи клейкої, яку містить одержаний відомим 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.

Відомий також спосіб отримання протимікробного, кровоспинного та цитотоксичного засобу з кори рослин роду вільха [Пат. 56771 A, МПК Україна, 7 A61K35/78, Заявл. 05.09.02р., Опубл. 15.05.03р., Бюл. №5], який передбачає знежирення подрібненої сировини хлороформом, екстракцію 70%-вим етанолом методом дрібної мацерації при загальному співвідношенні сировина-екстрагент 1:10-1:15. Вихід цільового продукту складає 17-24% від ваги сировини.

Проте зазначений спосіб передбачає використання додаткового реагента - хлороформу, що ускладнює технологічний процес та підвищує його вартість.

Завданням винаходу є створення способу отримання комплексу біологічно активних речовин (БАР) з рослинної сировини, який шляхом екстракції листя ясен звичайного 70% спиртом етиловим при підвищеній температурі та заданому спів-

(13) C2

(11) 79873

(19) UA

відношенні сировини до екстрагенту забезпечує одержання комплексу БАР з вираженою протимікробною та мембраностабілізуючою дією при високому виході цільового продукту, причому одержаний комплекс може бути використаний як безпосередньо у формі густого екстракту, так і в якості лікарської субстанції для одержання препаратів у різних лікарських формах.

Задача вирішується таким чином, що у способі одержання комплексу БАР з протимікробною та мембраностабілізуючою дією шляхом дрібної екстракції подрібненої рослинної сировини 70% спиртом етиловим з наступною фільтрацією та упарюванням одержаного сумарного екстракту, згідно з винаходом передбачено, що у якості сировини використовують листя ясена звичайного, а екстракцію проводять при температурі близько 90°C при співвідношенні сировини до екстрагенту як 1:15-1:20.

Технологічні прийоми та режими здійснення заявленого способу визначені експериментальним шляхом.

Експериментально доведено, що спектр біологічної активності екстракту, одержаного за заявленим способом, обумовлений вмістом у ньому фенольних сполук.

Авторами досліджено біологічну активність листя ясена звичайного і створено спосіб отримання з нього комплексу БАР з вираженою протимікробною та мембраностабілізуючою дією з високим виходом готового продукту.

Експериментальним шляхом в якості екстрагента був вибраний спирт етиловий, тому, що він здатний вичерпно екстрагувати комплекс фенольних сполук з листя ясена звичайного, крім того, він належить до найпоширеніших екстрагентів, які використовуються у фітохімічних виробництвах. Оптимальна для заявленого способу 70% концентрація екстрагенту вибрана дослідним шляхом. Листя ясена звичайного багаті на фенольні сполуки, а саме гідроксикоричні кислоти, гідроксикумарини та флавоноїди. Виходячи з цього ефективність розчинника різних концентрацій оцінювали за наступними критеріями: вміст екстрактивних речовин та суми окислювальних фенолів (СОФ). Дані експерименту приведені у таблиці 1.

За даними табл. 1 використання в якості екстрагента спирту етилового 70% концентрації найоптимальніше з точки зору вмісту як екстрактивних речовин (ЕР), так і суми окислювальних фенолів (СОФ).

Співвідношення сировини-екстрагент було теж вибрано експериментальним шляхом. Вміст ЕР та СОФ у екстрактах, одержаних при різному співвідношенні сировини до екстрагенту наведені у таблиці 2.

Дані таблиці 2 свідчать, що оптимальним є співвідношення сировини до екстрагенту як 1:15-1:20. Зменшення співвідношення призводить до різкого зниження вмісту як екстрактивних речовин, так і фенольних сполук у екстракті, а збільшення співвідношення економічно недоцільне внаслідок незначного збільшення вмісту екстрагованих речовин.

Використання у заявленому способі фільтрування необхідне для запобігання можливої присутності у кінцевому продукті часток подрібненої сировини.

Для забезпечення високого виходу готового продукту та створення умов для вичерпної екстракції з листя ясена звичайного комплексу БАР з протимікробною дією у заявленому способі передбачено проведення екстракції при температурі близько 90°C. Вибір температурного режиму обумовлений виходом готового продукту і вмістом у ньому ЕР та СОФ. Порівняльні дані, одержані при здійсненні заявленого способу при кімнатній температурі та 90°C, наведені у таблиці 3.

Дані таблиці 3 беззаперечно свідчать на користь проведення екстракції при температурі 90°C.

Заявлений спосіб включає стадію упарювання для отримання інших концентратів кінцевого продукту - крім густого, також сухого екстракту. Це дає більший простір маневрування у технологічному аспекті при створенні ряду лікарських форм, таких, як супозиторії, гелі, таблетки тощо. Використання густого та сухого екстракту дозволить запобігти таких незручностей як неточність дозування, наявність залишків екстрагенту.

Спосіб здійснюють наступним чином: подрібнені до розміру часток 0,5-3,0мм листя ясена звичайного завантажують в екстрактор, заливають 70% етанолом до дзеркала, екстрагують протягом 1 години, екстракт зливають у прийомник. Екстракцію проводять ще двічі. Отримані екстракти (загальне співвідношення сировини: екстрагент 1:15-1:20) об'єднують, при необхідності фільтрують та упарюють до густого або сухого екстрактів. Екстракцію проводять при температурі близько 90°C з використанням киплячого водяного ogrivника або екстрактора з подвійним кожухом.

Вихід цільового продукту складає 24-31% від повітряно-сухої ваги сировини.

Спосіб ілюструється конкретними прикладами.

Приклад 1. 5кг подрібненого до розміру часток 0,5мм листя ясена звичайного завантажують у екстрактор, заливають 25л 70% спирту етилового, екстрагують протягом 1 години, екстракт зливають у прийомник. Екстракцію проводять ще двічі порціями також по 25л 70%-вого спирту етилового. Отримані екстракти (загальне співвідношення сировини-екстрагент 1:15) в обсязі 70л об'єднують, фільтрують та упарюють. Екстракцію здійснюють на водяній бані з температурою водяного ogrivника 90°C.

Вихід цільового продукту складає 24,3% від повітряно-сухої ваги сировини.

Приклад 2. 5кг подрібненого до розміру часток 1мм листя ясена звичайного завантажують у екстрактор з подвійним кожухом, заливають 40л 70% спирту етилового, екстрагують протягом 1 години, екстракт зливають в прийомник. Екстракцію проводять аналогічно двічі порціями по 30л 70% спирту етилового. Отримані екстракти (загальне співвідношення сировини-екстрагент 1:20) в обсязі 96л об'єднують, фільтрують і упарюють до густої концентрату (вологість 16%). Екстракцію здійснюють при температурі 90°C.

Вихід цільового продукту складає 31,00% від ваги повітряно-сухої сировини.

Приклад 3. 5кг подрібненого до розміру часток 3мм листя ясена звичайного завантажують у екстрактор, заливають 35л 70% спирту етилового, екстрагують протягом 1 години, екстракт зливають в прийомник. Екстракцію проводять ще двічі порціями по 25л 70% спирту етилового. Отримані екстракти (загальне співвідношення сировина-екстрагент 1:17) в обсязі 80л об'єднують, фільтрують, упарюють у вакуумі до густої консистенції. Після цього сушать в вакуум-сушильній шафі або сушарці до сухого залишку. Екстракцію здійснюють на водяній бані з температурою водяного огрівника 90°C.

Вихід цільового продукту складає 27,80% від ваги сировини.

Приклад 4. Протимікробну активність комплексу БАР, отриманих за заявленим способом (далі густий екстракт листя ясена звичайного) вивчали за стандартним методом дифузії в агар (метод "колодязів") з використанням двошарової заливки чашок Петрі. В якості тест-штамів використовували еталонні штами із американської типової колекції культур мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 і *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

В якості критерію протимікробної активності вибраний розмір діаметру затримки росту мікроорганізмів.

Результати наведені у таблиці 4.

З даних таблиці 4 витікає, що комплекс БАР, одержаний за заявленим способом, у формі густого екстракту листя ясена звичайного має досить широкий спектр протимікробної активності, у відношенні грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів. Найбільш виражена протимікробна

активність густого екстракту листя ясена звичайного у відношенні культур *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*.

Приклад 5. Мембраностабілізуючу дію густого екстракту листя ясена вивчали за допомогою удосконаленого методу Шрека.

При проведенні досліду у пробірці вносили у рівних об'ємах клітинну завись (з концентрацією 240000 кліток в мл³) та 1% розчин тетрацикліну. У контрольну серію додавали рівний об'єм фізіологічного розчину, до дослідної серії-рівний об'єм досліджуваних сполук з попередньою розтитровкою. Час експозиції становив 15 хвилин. Було використано модель, на тлі якої тестувався препарат порівняння сілібор, який має Мембраностабілізуючу дію.

Мембраностабілізуючу дію досліджених засобів визначали у відсотках за відношенням різниці кількості живих клітин у дослідній пробірці та у контрольній серії. Результати наведені у таблиці 5.

Екстракт листя ясена звичайного має мембраностабілізуючу дію, що перевищує дію силібору, крім того, одержаний комплекс БАР за заявленим способом на відміну від сілібору має протизапальну дію.

Таким чином заявлено спосіб одержання комплексу БАР з листя ясена звичайного з вираженою протимікробною та мембраностабілізуючою дією. Заявлений спосіб простий, економічний, передбачає використання доступної вітчизняної сировини та екологічно безпечного реактиву, може бути здійснений на будь-якому фармацевтичному підприємстві зі стандартним обладнанням. Комплекс БАР, одержаний заявленим способом, може бути використаний у якості лікарського засобу у формі густого екстракту або як лікарська субстанція для створення препаратів у різних лікарських формах.

Таблиця 1

Вибір концентрації спирту етилового як екстрагента за заявленим способом

№ п/п	Концентрація екстрагенту	Вміст сполук у перерахунку на повітряно-суху сировину, %	
		екстрактивні речовини	СОФ
1	вода	35,10±0,20	2,87±0,03
2	10%-вий спирт етиловий	37,01±0,15	3,54±0,02
3	20%-вий спирт етиловий	28,90±0,05	3,49±0,04
4	30%-вий спирт етиловий	30,42±0,13	4,05±0,02
5	40%-вий спирт етиловий	25,03±0,15	3,78±0,03
6	50%-вий спирт етиловий	30,69±0,20	5,58±0,02
7	60%-вий спирт етиловий	40,22±0,20	6,36±0,04
8	70%-вий спирт етиловий	37,49±0,15	6,62±0,04
9	80%-вий спирт етиловий	31,49±0,13	5,26±0,03
10	96%-вий спирт етиловий	18,90±0,13	2,75±0,03

Примітка: результати є середніми 5-х визначень.

Таблиця 2

Вибір співвідношення сировини до екстрагенту

№ п/п	Співвідношення сировина-екстрагент	Вміст сполук у перерахунку на повітряно-суху сировину, %	
		ЕР	СОФ
1	1:5	25,44±0,15	4,87±0,03
2	1:10	32,17±0,20	5,32±0,02
3	1:15	39,86±0,20	8,83±0,04
4	1:20	40,08±0,13	9,05±0,02

Примітка: результати є середніми 5-х визначень.

Таблиця 3

Вибір температурного режиму

№ п/п	температурний режим	вихід, % (1:15-1:20)	ЕР, %	СОФ, %
1	кімнатна температура	28,32	37,28±0,20	4,55±0,04
2	нагрівання до 90°C	31,00	39,75±0,18	5,44±0,02

Примітка: результати є середніми 5-х визначень.

Таблиця 4

Протимікробна активність густого екстракту листя ясена звичайного

Тест-штами	Діаметр затримки росту мікроорганізмів, мм
1	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	14,04±0,02
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	13,04±0,02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	14,04±0,03
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	15,06±0,03
<i>Proteus mirabilis</i>	13,04±0,04
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 128	13,02±0,02

Примітка: дані є середніми значеннями 5-х визначень.

Таблиця 5

Вивчення мембаностабілізуючої дії густого екстракту листя ясена звичайного

Назва субстанції	Кількість живих клітин	Мембраностабілізуюча дія, %
1	2	3
контроль (нативний стан)	95,80±0,21	-
тетрациклін	49,20±0,41	-
силібор (з додаванням тетрацикліну)	49,70±0,12	1,07±0,12
екстракт листя ясена звичайного (з додаванням тетрацикліну)	60,30±0,10	22,56±0,10

Примітка: результати є середніми 5-х визначень.