



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 96882

(13) C2

(51) МПК (2011.01)

A61K 36/18 (2006.01)

A61K 127/00 (2006.01)

A61P 29/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ТА АНТИМІКРОБНОЮ АКТИВНІСТЮ

1

2

(21) а201013778

(22) 19.11.2010

(24) 12.12.2011

(46) 12.12.2011, Бюл. № 23, 2011 р.

(72) МАЛИЙ ВОЛОДИМИР ВАЛЕНТИНОВИЧ, ДА-
НИЛОВА ІРИНА АНАТОЛІЙВНА, ХВОРОСТ ОЛЬГА
ПАВЛІВНА, МАЛОШТАН ЛЮДМИЛА МИКОЛАЇВНА
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ

(56) RU 2152797 C1, 20.07.2000

UA 13236 U, 15.03.2006

UA 77795 C2, 15.01.2007

(57) Спосіб одержання засобу з протизапальною та антимікробною активністю, що включає трикратну екстракцію рослинної сировини водно-спиртовою сумішшю, об'єднання одержаних екстрактів з подальшим їх відстоюванням, фільтрацією та концентруванням до густого стану, який **відрізняється** тим, що як рослинну сировину використовують листя в'язу граболистого *Ulmus Carpinifolia* suckow, екстракцію здійснюють 40-60 % спиртом етиловим протягом двох годин при загальному співвідношенні сировина:екстрагент 1:(15-20) при температурі кипіння екстрагенту.

Винахід належить фармації та медицині, зокрема належить до способів одержання комплексів біологічно активних речовин з рослинної сировини, а саме - засобу з протизапальною та антимікробною активністю з листя ільму граболистого, призначеного для використання як активної лікарської субстанції у складі препаратів у різних лікарських формах.

Популярність фітотерапії останнім часом зростає. Це можна пояснити різними причинами, зокрема тим, що лікарські засоби рослинного походження у багатьох випадках діють м'якше, ніж синтетичні препарати, здебільшого не мають негативної побічної дії, внаслідок чого придатні до тривалого вживання, особливо при хронічних захворюваннях. Завжди актуальними є засоби з протизапальною та антимікробною дією, які можуть мати застосування при лікуванні широкого кола хвороб. Збільшення арсеналу таких засобів дозволить розширити можливості вибору для індивідуального підходу до лікування хворих.

Відомий спосіб одержання засобу з протизапальною, антимікробною та діуретичною дією з листя груші [1], згідно з якими сухе подрібнене листя груші звичайної екстрагують 10 % спиртом етиловим при співвідношенні сировини: екстрагент 1:9-1:11 при кімнатній температурі протягом 10-12 годин. Процес повторюють 5-7 разів з використанням нових порцій екстрагенту. Одержані екстрагенти об'єднують і упарюють до 1/18-1/12 попереднього об'єму.

До недоліків відомого способу можна віднести тривалість процесу, помірну протизапальну дію та відсутність вираженої антимікробної дії засобу, одержаного за таким способом.

Відомий також спосіб одержання ранозагоючого та антимікробного засобу [2] шляхом трикратної екстракції сухого листя горіху волоського 35-45 % спиртом етиловим при загальному співвідношенні сировини: екстрагент 1:5 і загальній тривалості процесу екстракції 38-74 години. Одержані екстракти об'єднують, відстоюють протягом 3 діб при температурі 6-10 °С, фільтрують та концентрують до стану густого або сухого екстрагенту. Вихід за сухим залишком становить 6-10 % від маси сировини. Недоліком відомого способу можна вважати довготривалість процесу та низький вихід цільового продукту.

Задача винаходу полягає у створенні нового способу одержання засобу з протизапальною та антимікробною дією шляхом використання нетрадиційної сировини - листя ільму граболистого, що у поєднанні з новими ознаками заявленого способу дозволяє одержати засіб з вираженою комплексною фармакологічною дією, з високими виходом кінцевого продукту при помірній тривалості технологічного процесу.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі одержання засобу з протизапальною та антимікробною активністю, що включає багаторазову екстракцію рослинної сировини водно-спиртовою сумішшю, об'єднання одержаних екст-

(13) C2

(11) 96882

(19) UA

рактів з подальшим їх відстоюванням, фільтрацією та концентруванням до густого стану, на відміну від прототипу передбачено, що як рослинну сировину використовують листя ільму граболистого, екстракцію здійснюють 40-60 % спиртом етиловим при загальному співвідношенні сировини до екстрагенту 1:15-1:20 протягом двох годин при температурі кипіння екстрагенту.

Як рослинну сировину для здійснення заявленого способу вибрано листя ільму (в'язу) граболистого (*Ulmus Carpinifolia suckow*) [3]. Відоме використання в народній медицині кори ільму граболистого у формі відварів або водних настоїв для лікування запалення слизових оболонок та лікування у вигляді компресів на рани, що погано загоюються. Листя ільму граболистого не є офіційною сировиною, а використання його спирто-

вих екстрактів з лікувальною метою невідоме з джерел інформації.

Авторами вперше досліджено протизапальну та антимікробну дію густого екстракту з листя ільму граболистого, одержаного за заявленим способом, та стандартизовано зазначений екстракт як лікарську субстанцію, придатну для використання як безпосередньо, так і у складі лікарських засобів, виконаних у різних лікарських формах для внутрішнього і зовнішнього застосування. Всі ознаки заявленого способу визначені експериментальним шляхом.

Критерієм визначення оптимального екстрагенту було вибрано вихід екстрактивних речовин і особливо суми окиснюваних фенолів з сировини. Результати дослідів узагальнено у таблиці 1.

Таблиця 1

Вибір екстрагента

№ з/п	Використаний екстрагент	Вихід сполук, ($X \pm \Delta X$)	
		екстрактивних речовин	суми окиснюваних фенолів
1	Вода очищена	36,81 \pm 0,75	4,13 \pm 0,15
2	10 % спирт	28,18 \pm 1,05	3,26 \pm 0,11
3	20 % спирт	28,20 \pm 0,92	4,28 \pm 0,14
4	30 % спирт	26,79 \pm 0,70	3,73 \pm 0,14
5	40 % спирт	28,04 \pm 0,61	4,45 \pm 0,14
6	50 % спирт	27,87 \pm 0,56	4,81 \pm 0,16
7	60 % спирт	21,72 \pm 0,28	4,54 \pm 0,15
8	70 % спирт	21,74 \pm 0,27	4,60 \pm 0,17
9	80 % спирт	23,26 \pm 0,48	4,72 \pm 0,17
10	96 % спирт	20,25 \pm 0,74	3,47 \pm 0,10

За результатами експериментів як екстрагент вибрано 40-60 % спирт етиловий, переважно 50 % спирт етиловий, (за співвідношенням суми окиснюваних фенолів та екстрактивних речовин).

Узагальнені експериментальні дані з вибору співвідношення сировина: екстрагент для 50 % спирту етилового наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Вибір співвідношення сировина: екстрагент

№ з/п	Співвідношення сировина-екстрагент	Вихід сполук, ($X \pm \Delta X$)	
		екстрактивних речовин	суми окиснюваних фенолів
1	1:5	18,72 \pm 0,28	3,41 \pm 0,11
2	1:10	23,26 \pm 0,48	4,45 \pm 0,14
3	1:15	25,79 \pm 0,70	4,60 \pm 0,17
4	1:20	27,45 \pm 0,14	4,72 \pm 0,17

За максимальним виходом екстрактивних речовин і суми окиснюваних фенолів визначено ефективне співвідношення сировина : екстрагент 1:15-1:20. Збільшення співвідношення понад 1:20 є економічно недоцільним і не призводить до суттєвого збільшення виходу корисних речовин.

Експериментальним шляхом визначено, що оптимальному варіанту здійснення заявленого способу відповідає трикратне екстрагування сировини протягом 2 години кожного разу при сумарному співвідношенні сировина: екстрагент у заявленому інтервалі 1:15-1:20, причому процес

найбільш ефективний при температурі кипіння вибраного екстрагенту.

Сукупність ознак заявленого способу є новою, невідомою з джерел інформації.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином.

Суше, подрібнене листя ільму граболистого екстрагують 40-60 % спиртом етиловим протягом двох годин при температурі кипіння екстрагенту. Одержаний екстракт зливають. Процес здійснюють тричі при сумарному співвідношенні сировина: екстрагент 1:15-1:20. Одержані екстракти

об'єднують, відстоюють протягом 24-48 годин при кімнатній температурі, фільтрують та концентрують переважно упарюванням під вакуумом до густого стану.

Вихід кінцевого продукту становить 23-25 % від ваги повітряно-сухої сировини. Одержаний за заявленим способом густий екстракт листя ільму граболистого має вигляд темно-коричневої смолеподібної субстанції зі слабким специфічним запахом та смаком, яка легко розчинна у 50 % спирті етиловому, дуже малорозчинна у 96 % спирті етиловому, практично нерозчинна у хлороформі та діетиловому ефірі. Згідно з параметрами стандартизації густого екстракту листя ільму граболистого, одержаного за заявленим способом, вміст суми окиснюваних фенолів у перерахунку на абсолютно сухий залишок має бути не менше 12,0 %, а вміст суми кислот гідроксикоричних у перерахунку на абсолютно сухий залишок у розрахунку на кислоту хлорогенову має бути не менше 5,0 %.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1.

5 кг подрібненого до середнього розміру часток $3,16 \pm 0,07$ мм сухого листя ільму граболистого екстрагували 25 л 50 % спирту етилового (1:5) (тут і надалі кількість екстрагенту наведено без збільшення на поглинання сировиною та інші технологічні втрати), при температурі кипіння екстрагента 84°C протягом 2 годин. Одержаний екстракт злили у збірник. Ту ж саму порцію сировини ще двічі екстрагували 50 % спиртом етиловим при співвідношенні 1:5 (загальне співвідношення 1:15) за аналогічних умов. Всі одержані екстракти об'єднали, відстоювали протягом доби при кімнатній температурі та профільтрували з метою очищення від механічних домішок та баластних речовин, що випали в осад при відстоюванні. Очищений екстракт упарили у вакуум - циркуляційному апараті до густого стану. Вихід склав 24 % від повітряно-сухої сировини.

Приклад 2.

7 кг подрібненого сухого листя ільму граболистого трикратно екстрагували 40 % спиртом етиловим способом, аналогічним наведеному у прикладі 1. Вихід готового продукту – 23 % від повітряно-сухої сировини.

Приклад 3.

5 кг подрібненого сухого листя ільму граболистого тричі екстрагували 60 % спиртом етило-

вим по 2 години при температурі кипіння екстрагенту і загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:20. Об'єднаний екстракт відстоювали протягом двох діб. Після упарювання одержали густий екстракт листя ільму граболистого з виходом 25 % від повітряно-сухої сировини.

Приклад 4.

Вивчення протизапальної активності густого екстракту листя ільму граболистого у дозі 50 мг/кг проводили на моделі зимозанового набряку у щурів. Густий екстракт розчиняли у воді для ін'єкцій та вводили дослідним тваринам внутрішньошлунково. Як референт-препарат було вибрано кверцетин у дозі 50 мг/кг, яка є дозою ЕД 50 за протизапальною активністю. Досліджувані препарати вводили за 1 год. до індукції запалення. Контрольним тваринам вводили еквівалентну кількість води.

Гостре асептичне запалення відтворювали введенням щурам зимозану субплантарно у вигляді 2 % суспензії у дозі 0,1 мл на тварину через 1 год. після введення досліджуваних препаратів.

Вимірювання величини набряку лап у щурів проводили за допомогою механічного онкометра за Захаревським А.С. у динаміці: через 1, 2, 3, 6 і 24 год. після введення зимозану.

Протизапальну активність густого екстракту листя ільму граболистого при гострому ексудативному запаленні визначали антиексудативним ефектом, тобто здатністю зменшувати розвиток набряку у порівнянні з групою контрольної патології, і розраховували за наступною формулою:

$A=100-$

де A - протизапальна активність, %;

M_0 - об'єм набряклої лапи в досліді (у лікованих тварин);

M_3 - об'єм здорової лапи в досліді;

M_0^k - об'єм набряклої лапи в контролі (у нелікованих тварин);

M_3^k - об'єм здорової лапи в контролі.

Результати проведеного дослідження наведені в таблиці 3.

Отримані дані свідчать, що в умовах зимозанового запалення густий екстракт листя ільму граболистого виявляє виражену протизапальну активність та достовірно, порівняно з контролем, зменшує об'єм набряклої кінцівки. Протизапальна активність густого екстракту у дозі 50 мг/кг на

Таблиця 3

Протизапальна активність густого екстракту листя ільму граболистого на моделі зимозанового набряку у щурів (n=6)

Умови досліді	Дози, мг/кг	Об'єм набряку, у/о	Протизапальна активність, %
контроль	-	$29,0 \pm 2,4$	-
густий екстракт листя ільму граболистого	50	$16,8 \pm 0,65^{**}$	42,0
Кверцетин	50	$22,0 \pm 1,77^*$	24,0

* - розбіжність вірогідна по відношенню до контролю;

** - розбіжність вірогідна по відношенню до препарату порівняння

моделі зимозанового набряку становила 40,2%, що в 1,67 рази вище за активність препарату порівняння кверцетин (24,0%).

Приклад 5.

Антимікробну активність заявленого засобу вивчали у дослідях *in vitro* за відомими методиками дифузії в агар (метод "колодязів") з використанням двошарової заливки чашок Петрі. Для випробування використовували наступні штами

мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus*, штам ATCC 25923; *Escherichia coli*, штам ATCC 25922; *Bacillus subtilis*, штам ATCC 6633; *Candida albicans*, штам ATCC 85/653. Як критерій фармакологічної активності вибрано діаметри зон затримки росту мікроорганізмів.

Результати вивчення спектру антимікробної активності засобу, одержаного за заявленим способом, наведені у таблиці 4.

Таблиця 4

Вивчення антимікробної активності густого екстракту листя ільму граблистого

Досліджуваний засіб	Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів (мм)			
	St. aureus ATCC 25923	E. coli ATCC 5922	B. subtilis ATCC 6633	C. albicans ATCC 85/653
Густий екстракт листя ільму граблистого	14,80± 1,04	14,80±1,04~	15,20 ±1,04	13,60 ±1,42

Аналіз отриманих даних свідчить, що засіб, одержаний за заявленим способом, проявляє достовірну антимікробну дію у відношенні найпоширеніших патогенних мікроорганізмів.

Таким чином, заявлено новий спосіб одержання засобу рослинного походження, а саме з листя ільму граблистого, з протизапальною та антимікробною дією. Одержаний за новим способом засіб призначений для використання як лікарської субстанції у фармацевтичних препаратах з різними лікарськими формами, і може знайти застосування у різних галузях медицини: стоматології, отоларингології, дерматології, гастроентерології тощо. Заявлений спосіб простий у

використанні, може бути здійснений на стандартному обладнанні фармацевтичних підприємств, причому для впровадження даного способу існує достатня вітчизняна сировинна база.

Джерела інформації

1. Патент 77347, Україна, МПК (2006) A61K36/185, A61K127/00(2006.01), A61P29/00, A61P31/00, A61P13/00, заявл. 26.04.2005, опубл. 11.11.2006, бюл. №11.

2. Патент 2152797, РФ, МПК 7 A61K35/78, A61P17/02, заявл. 02.06.1999, опубл. 20.07.2000, бюл. № 20.

3. <http://medicina.kharkov.ua/herbal/vjaz.html>