



УКРАЇНА

(19) UA (11) 53420 (13) U
(51) МПК
A61K 36/49 (2006.01)
A61K 129/00 (2006.01)
A61P 31/08 (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 ЗАСОБУ З ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ, МЕМБРАНОСТАБІЛІЗУЮЧОЮ ТА АНТИМІКРОБНОЮ АКТИВНІСТЮ

1

(21) u201002924
(22) 15.03.2010
(24) 11.10.2010
(46) 11.10.2010, Бюл.№ 19, 2010 р.
(72) ЯРНИХ ТЕТЯНА ГРИГОРІВНА, ХОХЛЕНКОВА
НАТАЛІЯ ВІКТОРІВНА, БУРЯК МАРИНА ВАЛЕРІЙ-
ВНА, ЯКОВЛЕВА ЛАРИСА ВАСИЛІВНА, ТКАЧОВА
ОКСАНА ВІТАЛІЙВНА
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ

2

(57) Спосіб одержання засобу з протизапальною, мембраностабілізуючою та антимікробною дією, що включає екстракцію кори дуба гарячою водою з подальшим очищенням та концентруванням одержаного екстракту, який **відрізняється** тим, що екстракцію кори дуба, подрібненої до розміру часток $\leq 1,0$ мм, здійснюють у вакуумно-фільтраційному екстракторі при температурі води 85-95°C до одержання 5-6 об'ємів екстракту на одиницю маси сировини.

Корисна модель відноситься до фармації, а саме до способів одержання засобів у вигляді екстрактів рослинного походження, придатних для використання як безпосередньо, так і в якості лікарських субстанцій у складі препаратів у різних лікарських формах з переважно протизапальною, мембраностабілізуючою та антимікробною активністю.

Багатовікові традиції і досвід застосування в народній медицині сформували глибоку довіру до лікарських рослин у всіх соціальних верств населення. Рослини використовуються в медицині на протязі багатьох століть. Не дивлячись на значний прогрес сучасної органічної хімії, яка забезпечує виробництво високоякісних синтетичних фармакологічно активних речовин, що використовуються у фармації, популярність рослинних препаратів у всьому світі не тільки не падає, але і невпинно зростає. Згідно зі статистикою до 20-60% лікарських призначень у різних країнах становлять препарати лікарських рослин. Подібна тенденція обумовлена більш м'якою дією фітопрепаратів, меншою резистентністю і практичною відсутністю побічних ефектів.

Серед рослин, які широко використовуються у традиційній та народній медицині відомий дуб звичайний (*Quercus robur*) [1]. Кора дуба містить катехінові таніни (0,4%), вільну галову та елагову кислоти, галотаніни (10-20%), кверцетин, флобафен, смоли, пектинові речовини (6%), цукри (левулін та інші), білки, слиз, крохмаль та мінеральні речови-

ни. У народній медицині кору дуба використовують як протизапальний, в'яжучий і антимікробний засіб при запаленнях слизової оболонки ротової порожнини, глотки і гортані, при гінгівіті, стоматиті, пародонтозі, флюсі, гастриті, при шлункових кровотечах, проносі, ентериті й хворобах печінки та селезінки, при рахіті, випадінні прямої кишки й туберкульозі, при захворюваннях лімфатичних вузлів, захворюваннях шкіри (екзема, тріщини, відмороження, опіки тощо), а також при отруєнні грибами, алкалоїдами та солями міді, свинцю й олова. В гінекологічній практиці відвар кори дубу використовують для спринцювань при шийкових і піхвових білях, вульвовагініті й виразковому кольпіті; внутрішньо приймають при надмірних місячних. Для внутрішнього і зовнішнього використання одержують настої (на окропі або холодній кип'яченій воді) та відвари кори дуба.

У офіційній медицині кору дуба звичайного [2] використовують як в'яжучий засіб у вигляді водного відвару (1:10) для полоскання, зовнішньо - у вигляді 20% відвару. Засіб показаний при гінгівіті, стоматиті, ларингіті, фарингіті, опіках.

Проте відвари та настої кори дуба, одержані відомими способами, мають ряд суттєвих недоліків, таких як обмежений термін застосування, відсутність можливості стандартизації та контролю якості, недостатньо повне вилучення біологічно активних речовин з сировини, неможливість безпосереднього використання у інших лікарських формах.

(19) UA (11) 53420 (13) U

Відомий також спосіб одержання засобу, що має антимікробні, імуномодельючі, виразкозагоєвальні та антикоагулятивні властивості [3], згідно з яким кору дуба екстрагують дистильованою водою у масовому співвідношенні 1:12-15 при 70-80°C трикратно, при цьому першу екстракцію проводять протягом 120хв., а наступні протягом 60 хв., об'єднанні витяги се парують, упарюють до 1/3 попереднього об'єму, знов сепарують і сушать шляхом розпилення. При здійсненні зазначеного способу кору дуба подрібнюють до розміру часток ≤ 10 мм. У описанні технологічного процесу, як одного з прикладів реалізації відомого способу, зазначено, що у реакторі до початку роботи створюється тиск 0,07МПа (0,7кгс/см) за допомогою інертного газу (азоту), після чого завантажують воду, а потім - сировину. Екстракцію здійснюють при перемішуванні протягом фіксованого часу. Після завантаження процесу витяг за допомогою тиску інертного газу перетискують крізь фільтрувальний матеріал несправжнього дна екстрактора до збірника. Цільовий продукт, одержаний за відомим способом - сухий екстракт з зазначеними вище фармакологічними властивостями.

До недоліків відомого способу можна віднести фіксований, досить тривалий час екстракції, проблематичність вичерпного вилучення комплексу біологічно активних речовин (БАР) з сировини внаслідок її подрібнення до досить великих часток, необхідність використання азоту для проведення процесу, додаткове здійснення перемішування у процесі екстрагування та подвійну сепарацію одержаного екстракту, що призводить до зростання економічних витрат на здійснення способу.

Завдання корисної моделі полягає у створенні нового способу одержання густого екстракту кори дуба, який завдяки використанню вакуумно фільтраційної екстракції при заданих параметрах способу забезпечує виснаження сировини мінімальною кількістю екстрагента і одержання висококонцентрованого густого екстракту з проти-запальною, мембраностабілізуючою та антимікробною дією, придатного до безпосереднього використання або при створенні лікарських засобів у різних лікарських формах.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі одержання засобу з проти-запальною, мембраностабілізуючою та антимікробною дією, що включає екстракцію подрібненої кори дуба гарячою водою з подальшим очищенням та концентруванням одержаного екстракту, винаходом передбачено, що екстракцію кори дуба, подрібненої до розміру часток $\leq 1,0$ мм, здійснюють за допомогою вакуумно фільтраційної екстракції при температурі води 85-95°C до одержання 5-6 об'ємів витягу на одиницю маси сировини, а одержаний витяг фільтрують та упарюють до залишкової вологості не більше 25%. Параметри заявленого способу визначені експериментальним шляхом.

Одним з вирішальних факторів у підвищенні виходу діючих речовин та інтенсифікації процесу екстракції є подрібнення рослинного матеріалу. Основна мета подрібнення - максимальне руйнування клітинних структур з метою збільшення поверхні контакту екстрагенту з сировиною. Подріб-

нення кори дуба до розмірів часток $\leq 1,0$ мм обумовлює розчинення і фронтальний змив БАР з високо розвинутої поверхні подрібненого рослинного матеріалу. Така ступінь подрібнення сировини досягається вальцюванням.

Використання вакууму забезпечує максимальне вилучення БАР з сировини і одержання висококонцентрованих витягів, дозволяє різко скоротити час екстракції, що не лише економічно вигідно, а й попереджає небажані процеси взаємодії груп екстрагованих речовин та хімічні перетворення (окислення, гідроліз тощо) окремих речовин, які виникають при тривалому екстрагуванні.

Вибір в якості екстрагента води 85-95°C забезпечує ефективне вилучення у відповідності з заявленим способом з кори дуба комплексу БЛР переважно з протизапальними, мембраностабілізуючими та антимікробними властивостями.

Експериментальним шляхом було визначено, що 5-6-кратний по відношенню до маси повітряно сухої сировини об'єм одержаного за заявленим способом витягу містить понад 90% від загального вмісту екстрактивних речовин у корі дуба. Одержання більшого об'єму витягу не призводить до суттєвого зростання цього показника і є економічно недоцільним.

Час проведення екстракції на відміну від прототипу не є фіксованою величиною. Він змінюється у залежності від маси та товщини шару сировини у екстракторі і варіює від декількох хвилин до декількох годин.

Окремі параметри заявленого способу відомі і застосовуються у фармацевтичному виробництві, проте заявлена сукупність ознак способу переробки саме кори дуба є новою, невідомою з джерел інформації та такою, що забезпечує одержання кінцевого продукту з зазначеним спектром фармакологічної активності.

Заявлений спосіб здійснюється наступним чином. Подрібнену до розміру часток $\leq 1,0$ мм кору дуба завантажують у вакуумно фільтраційний екстрактор з несправжнім дном, додають воду при 85-95°C у кількості необхідній для одержання 5-6 об'ємів витягу на одиницю маси сировини. Витяг отримують за допомогою вакууму. Відфільтрований через несправжнє дно під впливом вакууму витяг додатково фільтрують та упарюють на вакуум-випарному апараті до залишкової вологості не більше 25%. Одержують продукт у формі густого екстракту коричневого кольору з характерним запахом, придатний до тривалого зберігання.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1.

205,0г кори дуба подрібнили методом вальцювання на валковій дробарці марки ВП-320-160-160 та просіяли крізь сито з розміром отворів $(1,0 \pm 0,03)$ мм. Втрата сировини після стадій подрібнення і просіювання склала 5,0г. Вміст екстрактивних речовин у сировині становив 15,85%.

200,0г подрібненої сировини помістили в вакуумно фільтраційний екстрактор. Додали 1800мл води очищеної (температура 95°C) до отримання після вакуумування 6-кратного об'єму витягу по відношенню до маси сировини, тобто 1200мл. Процес тривав 5 хвилин. Після додаткової фільт-

рації 1200мл одержаного витягу помістили у вакуум-випарний апарат і згустили при температурі 65°C і залишковому тиску 70кПа/см² до отримання густого екстракту з вологістю не більше 25%. Контроль упарювання проводили за кількістю води, що відігналася у збірнику (близько 1180мл). Отримали 20,0г густого екстракту кори дуба. Вміст дубильних речовин в отриманому екстракті склав 60% в перахунку на танін спектрофотометричним методом в УФ-області спектру.

Отриманий екстракт помістили у заздалегідь підготовлений стерильний контейнер з етикеткою.

Приклад 2.

100г кори дуба, подрібненої до розміру часток ≤ 1,0мм, піддали екстракції за заявленим способом за аналогією з прикладом 1. Процес тривав 2 хвилини. Одержали 10,0г густого екстракту кори дуба.

Приклад 3.

Протизапальну активність екстракту кори дуба (ЕКД), одержаного за заявленим способом, оцінювали за ступенем його антиексудативної дії на моделі гострого карагенінового набряку стопи у білих щурів масою 180-200г. Вибір моделі обґрунтований тим, що на різних етапах розвитку ексудативного карагенінового запалення, яке є системним, беруть участь різні ендogenousні флоготропні агенти: серотонін, гістамін, кініні та простагландини [5]. Це дозволяє опосередковано визначити наявність та механізм протизапальної дії досліджуваної субстанції.

Набряк викликали субплантарним введенням 0,1мл 1% розчину карагеніну в одну із задніх кінцівок тварин дослідних та контрольної груп через 1 годину після введення водного розчину ЕКД та препарату порівняння. Досліджуваний препарат вводили внутрішньошлунково, одноразово у діапазоні доз від 25 до 250мг/кг, а препарат порівняння Вольтарен - у дозі 8,0мг/кг. Контрольна група щурів одержувала еквівалентну кількість розчинника.

Про розвиток набряку судили за збільшенням об'єму стопи, який вимірювали у динаміці через 1, 2, 3, 4 і 5 годин за допомогою механічного онкометра. Протизапальну активність препаратів визначали за здатністю зменшувати набряк у дослідних тварин у порівнянні з тваринами контрольної патології. Розрахунок проводили за формулою:

$$A = \frac{\Delta V_k - \Delta V_d}{\Delta V_k} \cdot 100\%,$$

де A - протизапальна активність, %;

ΔV_d і ΔV_k - різниця в об'ємі набряклої та здорової стопи відповідно у дослідній групі і в групі контрольної патології.

Результати дослідів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Протизапальна активність екстракту кори дуба, одержаного за заявленим способом, і препарату порівняння на моделі карагенінового набряку у щурів, ($\bar{x} \pm S_x$)

Препарати	1 год.		2 год.		3 год.		4 год.		5 год.		Середня активність, A, %
	ΔV , у. о.	A, %	ΔV , у. о.	A, %	ΔV , у. о.	A, %	ΔV , у. о.	A, %	ΔV , у. о.	A, %	
Контрольна патологія	15,00±1,67	-	30,60±0,93	-	32,20±0,86	-	32,60±1,81	-	29,60±2,04	-	
ЕКД, 25мг/кг	8,00±1,29*	46,7	13,00±1,18*	57,5	20,67±2,42*	35,8	27,67±2,12	15,1	30,17±1,49**	-	31,6
ЕКД, 50мг/кг	7,60±1,39*	49,3	13,60±1,96*	55,5	25,00±2,63	22,4	23,80±4,04	27,0	23,80±3,94	19,6	34,8
ЕКД, 75мг/кг	6,80±1,39*	54,7	17,80±3,50*	41,8	18,20±3,71*	43,5	19,60±2,01	40,0	18,20±2,01	38,5	43,7
ЕКД, 100мг/кг	7,20±1,59*	52,0	14,80±2,06*	51,6	21,60±2,52	33,0	20,00±2,76	38,7	18,40±2,68	37,8	42,6
ЕКД, 125мг/кг	8,80±1,36*	41,3	18,80±2,35*	38,6	19,00±2,39*	41,0	19,60±3,68	40,0	18,00±1,79	39,2	40,0
ЕКД, 150мг/кг	7,80±0,97*	48,0	15,00±2,59*	51,0	22,00±2,19*	31,7	17,80±1,53	45,4	16,40±1,96	44,6	44,1
ЕКД, 200мг/кг	10,83±1,90	27,8	23,33±2,65**	23,8	24,17±2,40**	25,0	20,33±2,32	37,6	17,33±2,33	41,5	31,2
ЕКД, 250мг/кг	13,50±2,53	10,0	24,83±2,85**	19,0	26,67±3,05**	17,2	23,50±2,62	28,0	20,33±2,44	31,3	21,1
Вольтарен, 8мг/кг	8,00±1,81*	46,7	9,17±1,45*	70,0	13,00±1,10*	60,0	15,17±1,99*	53,5	12,50±2,91*	57,8	57,6

Примітки: 1)* - відхилення достовірне щодо контрольної патології, $p \leq 0,05$;

2) ** - відхилення достовірне щодо препарату порівняння, $p \leq 0,05$;

3) ΔV , у. о. - величина набряку в умовних одиницях;

4) A, % - протизапальна активність, %;

5) n = 6.

Аналіз даних таблиці 1 свідчить, що ЕКД, одержаний за заявленим способом, виявив протизапальну активність у всіх досліджених дозах. Починаючи з дози 25мг/кг і до дози 150мг/кг середня активність ЕКД поступово зростала (31,6%-44,1%). Подальше збільшення дози ЕКД до 200-250мг/кг призводить до зменшення антиексудативної активності (21,1%-31,2%). Порівняно з активністю вольтарена, активність ЕКД не поступається активності препарату порівняння на 1-й годині дослідження в інтервалі доз 25-150мг/кг. Враховуючи той факт, що вольтарен має негативну побічну дію, а досліджений ЕКД довели його нетоксичність, ЕКД має певні переваги, особливо при тривалому застосуванні.

Приклад 4. Дослідження мембраностабілізуючої активності ЕКД, одержаного за заявленим способом, проведено на моделі спонтанного гемолізу еритроцитів за методом F.C. Jager [6]. Експеримент базується на спектрофотометричному визначенні при довжині хвилі 540 нм екстинкції позаеритроцитарного гемоглобіну, що надходить у кров внаслідок гемолізу еритроцитів, викликаного пероксидним окисненням ліпідів киснем повітря.

Протягом 3-х днів дослідна група щурів отримувала рег ос водний розчин ЕКД в умовно-

ефективній дозі 75мг/кг. Тварини другої дослідної групи отримували рег ос масляний розчин препарату порівняння вітаміну Е - класичного антиоксиданту в дозі 6мг/кг. Тварини інтактної групи, які слугували контролем, отримували внутрішньошлунково протягом 3-х днів питну воду.

На 4-й день експерименту у щурів з хвостової вени брали кров і визначали ступінь гемолізу еритроцитів у дослідних і контрольній групах за формулою:

$$X = \frac{E_1 + E_2}{2E_3} \times 100\%$$

де

X - ступінь гемолізу, %

E₁, E₂ - екстинкції першої і другої проб з робочим розчином;

E₃ - екстинкція проби з дистильованою водою.

Мембраностабілізуючу активність Ам розраховували за формулою:

$$Am = 100 - \frac{X_{\text{досл}}}{X_{\text{контр}}} \times 100, \text{ де}$$

Am - мембраностабілізуюча активність, %;

X_{досл} - ступінь гемолізу у тварин дослідних груп;

X_{контр} - ступінь гемолізу у тварин контрольної групи.

Результати дослідів наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Мембраностабілізуюча активність ЕКД на моделі спонтанного гемолізу еритроцитів у щурів ($\bar{x} \pm S_x$)

Дослідні групи	Ступінь гемолізу, ум. од.	Мембраностабілізуюча активність, %
Контрольна група	17,09±1,51	-
Екстракт кори дуба, 75мг/кг	11,37±1,49*	33,5 %
Вітамін Е, 6 мг/кг	10,84±0,80*	36,6 %

Примітки: 1) * - відхилення достовірне щодо контролю, $p < 0,05$;

2) n=6.

Результати дослідження свідчать про те, що ЕКД проявив виражений мембраностабілізуючий ефект - 33,5%, який відповідає рівню ефективності препарату порівняння - вітаміну Е (36,6%).

Приклад 5. Антимікробну активність ЕКД, одержаного за заявленим способом, вивчали за загально прийнятим у мікробіологічній практиці методом дифузії в агар у модифікації колодязів. Як тест-штами використовували набір еталонних штамів, регламентованих ДФУ [7]: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 885-653, та клінічні штами, отримані з гнійних виділень

хірургічних ран: *Streptococcus mitis* 19, *Proteus mirabilis* 023, *Klebsiella pneumoniae* 18141.

Про рівень антимікробної активності ЕКД робили висновок за діаметром зони затримки росту мікроорганізмів навколо лунки із препаратом і оцінювали зону інгібіції росту за наступною шкалою:

зона діаметром ≤ 14 -15мм - стійкий штам мікроорганізму;

зона діаметром 15-18мм - слабо чутливий штам;

зона діаметром ≥ 18 мм - чутливий штам мікроорганізму.

Дані експерименту наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Результати дослідження антимікробної активності екстракту кори дуба в умовах *in vitro*, ($\bar{x} \pm S_x$)

Препарат	Діаметр зони затримки росту мікроорганізму, мм							
	S.aureus	Str.mitis	E. coli	K.pneumoniae	P.aeruginosa	B.subtilis	P.mirabilis	C.albicans
ЕКД	25,0 \pm 0,37	30,0 \pm 0,37	15,0 \pm 0,37	23,0 \pm 0,37	25,0 \pm 0,37	20,0 \pm 0,37	17,0 \pm 0,37	21,0 \pm 0,37

Примітка: n=6.

Результати досліджень свідчать про широкий спектр антимікробної активності ЕКД, одержаного за заявленим способом. Позитивним моментом є також наявність у ЕКД вираженої активності по відношенню до *C.albicans*, що є прогностичним показником відсутності у нього дисбіотичних властивостей та може бути використано при створенні лікарських форм не тільки зовнішнього, а й внутрішнього застосування.

Додаткові дослідження гострої токсичності ЕКД, одержаного за заявленим способом, показали, що дана субстанція відноситься до V класу токсичності речовин, тобто є практично нетоксичною при внутрішньоочеревинному введенні ($LD_{50} > 2000 \text{ mg/kg}$). При дослідженні специфічної токсичності встановлено, що ЕКД, одержаний за заявленим способом, не проявив кумулятивних властивостей, алергізуючої та імунотоксичної дії. При тривалому застосуванні протягом одного та трьох місяців ЕКД не чинив шкідливої дії на внутрішні органи та системи лабораторних тварин, що підтверджено біохімічними та гістологічними дослідженнями.

Таким чином, заявлено новий спосіб одержання з кори дуба засобу з протизапальною, мембраностабілізуючою та антимікробною активністю, практично нетоксичного, придатного до тривалого застосування без негативної побічної дії, перспективного для одержання лікарських засобів аналогічної дії у різних лікарських формах.

Заявлений спосіб дозволяє мінімізувати час екстракції, суттєво підвищити вихід діючих речовин і одержати висококонцентрований екстракт з кори дуба з широким спектром фармакологічної активності.

Джерела інформації

1. Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник. За ред. А.М. Гродзінського. Київ, Головна редакція Української радянської енциклопедії ім. М.П. Бажана, 1991, С. 142-143.
2. Компендиум Лекарственные препараты 2008. В двух томах. Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. «Морион», киев, 2008, Т. II, С. 83.
3. Патент на винахід 2092173, РФ, МПК 6 А61К35/78, заявл. 03.11.92, опубл. 10.10.97, бюл. №28.
4. Т.П. Попова, А.С. Амосов, В.И. Литвиненко, В.М. Мишев Фильтрационная экстракция и ее аппаратное оформление / Фармаком, №2-3, 1994, С. 43-49.
5. Di Rosa M., Giroud J.P., Willoughby D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carragenen and turpentins // J.Pathol.- 1971.- V. 104.- №15. - P. 29.
6. Вороніна Л.М., Десенко В.Ф., Кравченко В.М. та ін. (1996) Посібник до лабораторних і семінарських занять з біологічної хімії.- Харків.: Основа, 432с.