



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **58691** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
A61K 36/00
A61P 13/00
A61P 31/00
A61P 3/00

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 ДІУРЕТИЧНОЮ, АНТИМІКРОБНОЮ ТА АНАБОЛІЧНОЮ АКТИВНІСТЮ

1

2

(21) u201010254

(22) 20.08.2010

(24) 26.04.2011

(46) 26.04.2011, Бюл.№ 8, 2011 р.

(72) КОВАЛЬОВ СЕРГІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ, ЗА-
ТИЛЬНИКОВА ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА, ДЕРКАЧ
НАТАЛЬЯ ВОЛОДИМИРІВНА, ОСОЛОДЧЕНКО
ТЕТЯНА ПАВЛІВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб одержання засобу з діуретичною, ан-
тимікробною та анаболічною активністю шляхом

трикратної екстракції рослинної сировини водою при загальному співвідношенні сировини і екстрагенту 1:20 при постійно підтримуваній температурі 90 °С з подальшою фільтрацією та упарюванням у вакуумі об'єднаних екстрактів до сухого порошку, який **відрізняється** тим, що екстракції піддають листя півників болотяних, першу екстракцію проводять при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 протягом 2,0 годин, другу та третю - при 1:5 відповідно по 1 годині кожна.

Корисна модель відноситься до хіміко-фармацевтичної промисловості, зокрема до способів одержання засобів рослинного походження з діуретичною, антимікробною та анаболічною активністю, які можуть бути використані в якості активної субстанції при створенні відповідних лікарських препаратів у різних лікарських формах, придатних для лікування і профілактики захворювань сечовидільної системи.

Терапія урологічних захворювань передбачає тривале застосування лікувальних засобів. У цьому випадку доцільне використання препаратів рослинного походження, які, на відміну від синтетичних, практично не мають побічної дії, як правило не викликають алергічної реакції, є не токсичними і придатними до тривалого застосування без формування залежності тощо. Лікування більшості захворювань сечовидільної системи потребує засобів з комплексною, переважно діуретичною, антимікробною та анаболічною дією. Проте арсенал таких препаратів рослинного походження є досить обмеженим.

Відомий спосіб одержання засобу з протизапальною, антимікробною та діуретичною дією з листя груші звичайної [1] шляхом багаторазової екстракції рослинної сировини 10 % спиртом ети-

ловим при співвідношенні сировина:екстрагент 1:9-1:11 протягом 9-11 годин з подальшим упарюванням об'єданого екстракту до 1/18-1/20 попереднього об'єму. Вміст сухого залишку у готовому продукті становить 24,3 %.

Недоліком наведеного способу є багатостадійність, що ускладнює його здійснення у виробничих умовах, надмірні витрати спирту етилового [1].

Відомий спосіб одержання засобу з протизапальною, імуномодуючою та антигіпоксантиною дією з трави півників молочно-білих [2] шляхом екстракції рослинної сировини 35-45 % спиртом етиловим при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10-1:12 протягом 10-12 годин з подальшою концентрацією та сушкою цільового продукту. Отриманий комплекс, має низьку токсичність та проявляє протизапальну, імуномодуючу та антигіпоксичну активність.

Недоліком наведеного способу є надмірні витрати спирту етилового. Крім того, спосіб не дозволяє одержати засіб з комплексною діуретичною, антимікробною та анаболічною активністю [2].

Найближчим до заявленого способу за сукупністю ознак є спосіб одержання біологічно активної

(19) **UA** (11) **58691** (13) **U**

субстанції з трави сої щетинистої з анаболічною дією [3], який передбачає двоступеневу екстракцію рослинної сировини гарячою водою при постійно підтримуваній температурі 100-105 °С при співвідношенні сировина:екстрагент 1:39-1:41 протягом 2 та 0,5 годин відповідно з подальшою фільтрацією та упарюванням об'єднаних екстрактів до густої консистенції з вмістом сухого залишку 65-75 %. Загальний вихід екстрактивних речовин становить 32,44 % від повітряно-сухої сировини.

Вищезазначений спосіб не дозволяє одержати засіб з комплексною діуретичною, антимікробною та анаболічною активністю [3].

Завданням корисної моделі є створення нового способу одержання засобу з діуретичною, антимікробною та анаболічною активністю шляхом екстракції листя півників болотяних при заданих умовах, в результаті чого одержують ефективний природний засіб з вираженою фармакологічною дією для лікування захворювань сечовидільної системи.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі одержання засобу з діуретичною, антимікробною та анаболічною дією шляхом трикратної екстракції рослинної сировини дистильованою водою при температурі 90 °С з подальшою фільтрацією та упарюванням у вакуумі об'єднаних екстрактів до сухого порошку згідно з корисною моделлю передбачено, що в якості рослинної сировини використовують листя півників болотяних, першу екстракцію здійснюють при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 протягом 2,0 годин, другу та третю - по 1:5 відповідно по 1 годині кожна.

Пошук нових видів рослин з заданою біологічною активністю дозволяє одержувати з них засоби, які розширюють арсенал існуючих лікарських препаратів і сприяють здійсненню індивідуального підходу до лікування хворих. В якості рослинної сировини для заявленого способу авторами було обрано листя півників болотяних (*Iris pseudacorus* L.). Півники болотяні - багаторічна трав'яниста рослина родини півникові (Iridaceae) є перспективним об'єктом фармакогностичного та фармакологічного вивчення. У народній медицині використовують корені півників болотяних як відхаркувальні, в'язучі, протизапальні, сечогінні, кровоспинні засоби [4]. Використання листя півників болотяних як лікарської рослинної сировини для одержання лікувальних засобів, зокрема, з діуретичною, антибактеріальною та анаболічною дією є невідомим з джерел інформації та неочевидним.

Всі параметри заявленого способу визначено експериментальним шляхом з урахуванням біологічної активності одержаного засобу, ефективності, доступності та нешкідливості реактивів, практично-го відтворення способу у промислових умовах.

Вибір екстрагента було здійснено експериментальним шляхом, виходячи з кількості одержаних екстрактивних речовин, вартості та екологічної безпечності екстрагента. Такий екстрагент є дешевим, доступним та екологічно безпечним.

Сумарне співвідношення сировина екстрагент 1:20 встановлено експериментальним шляхом та є оптимальним для даного виду сировини. При зме-

ншенні кількості екстрагенту погіршується процес екстракції. Збільшення екстрагенту понад задане співвідношення економічно недоцільне.

Загальна тривалість усіх етапів екстракції складає 4 години і є достатньою для вичерпного вилучення з сировини екстракту з діуретичною, антибактеріальною та анаболічною активністю.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином. Повітряно-сухе листя півників болотяних піддають трикратній екстракції дистильованою водою при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:20 та загальній тривалості екстракції - 4 години при температурі 90 °С. Першу екстракцію здійснюють при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 протягом 2,0 годин, другу та третю при співвідношенні - по 1:5 відповідно протягом 1 години кожна. Одержані водні екстракти об'єднують, відфільтровують та упарюють у вакуумі до одержання сухого темно-жовтого з характерним запахом порошку. Вихід готового продукту становить 21,5 % від повітряно-сухої сировини.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1. 1,0 кг повітряно-сухого, подрібненого листя півників болотяних залили 10,0 л дистильованої води і екстрагували при періодичному перемішуванні та постійно підтримуваній температурі 90 °С протягом 2,0 годин. Процес повторили ще двічі порціями екстрагенту по 5,0 л протягом 1 години після кожного додавання екстрагенту. Одержані екстракти відфільтрували під вакуумом, об'єднали і упарили у вакуум-ротаційному апараті при температурі 90-100 °С до отримання сухого продукту. Вихід сухого екстракту склав 21,5%.

Приклад 2. Вивчення діуретичної активності екстракту з листя півників болотяних, одержаного за заявленим способом, проводили на білих нелінійних щурах чоловічої та жіночої статі масою 180-200 г у дослідах за методом Є.Б. Берхіна [5]. Тварин було поділено на групи в залежності від одержуваного препарату. Тварини першої, другої та третьої групи одержували екстракт з листя півників болотяних у вигляді водно-олійної суспензії (розчинник ТВІН-80 та дистильована вода) у дозі 25, 40, 150 мл/кг від маси тварин відповідно. Тварини четвертої групи одержували препарат порівняння - настійку листя ортосифону тичинкового у дозі 40 мл/кг. П'ята група - контрольні тварини. Досліджувані препарати вводили перорально внутрішньошлунково за допомогою спеціального зонду. Усі тварини одержували водяне навантаження через шлунковий зонд, яке складало 3 % від маси тіла тварини. Після ведення речовин тварин поміщали в «обмінні клітки» для збору сечі та реєстрували діурез через 4 години.

Активність діурезу розраховували за формулою:

$$A = \frac{D_0 \cdot 100\%}{D_k}, \text{ де}$$

A - діуретивність діуреза, %;

D₀ - діурез у досліді з досліджуванним препаратом, мл;

D_k - діурез у контрольному досліді, мл.

Результати експерименту наведені у таблиці

1.

Таблиця 1

Вивчення діуретичної активності засобу, одержаного за заявленим способом

Досліджувані препарати	Об'єм сечі, мл	Діуретична активність, %
Екстракт з листя півників болотяних, 25 мг/кг	4,2 ± 0,3*/**	61,5
Екстракт з листя півників болотяних, 40 мг/кг	4,3 ± 0,2*/**	65
Екстракт з листя півників болотяних, 150 мг/кг	4,15 ± 0,2*/**	59,6
Настойка листя ортосифону тичинкового, 40 мг/кг	3,9 ± 0,3*	50
Контроль	2,6 ± 0,2	100

Примітка: *p<0,05, достовірність результатів по відношенню до контролю;

**p<0,05, достовірність результатів по відношенню до показників настойки листя ортосифону тичинкового.

За даними таблиці 1 екстракт з листя півників болотяних достовірно збільшують сечовиділення не залежно від дозування. Найбільш ефективним є екстракт з листя півників болотяних у дозі 40 мг/кг, яка є терапевтично ефективною для препарату порівняння. Аналіз результатів дослідження свідчить, що у даному експерименті за діуретичною дією екстракт з листя півників болотяних перевищує настойку листя ортосифону тичинкового на 10-15,5 %.

Приклад 3. Антимікробну активність екстракту з листя півників болотяних, одержаного за заявленим способом, вивчали, використовуючи метод дифузії агар та набір еталонних штамів: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Eschericia coli*

ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Basillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 885/653 [6]. Мікробне навантаження до музейних штамів становило 10⁷ мікробних кліток на 1 мл середовища та визначалося за оптичним стандартом мутності McFarland.

Сумарний препарат листя півників болотяних розчиняли у воді дистильованій, ДМСО, 40 % та 50 % спирті етиловому. Концентрація досліджуваних екстрактів становила 10,0 % та 20,0 %. В якості контролю використовували чисті розчинники у концентраціях, що відповідають їх вмісту у препаратах. Дані дослідження наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Вивчення антимікробної активності екстракту з листя півників болотяних, одержаного за заявленим способом

Розчинник	Діаметр зон затримки росту мікроорганізмів у мм. M ± m, p<0,05						
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Eschericia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Basillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 885/653
1	2	3	4	5	6	7	8
10,0 % розчин екстракту							
Вода	15,5 ± 2,05	14,5 ± 0,92	16,5 ± 0,92	ріст	ріст	19,6 ± 2,34	15,0 ± 1,30
ДМСО	18,2 ± 1,30	18,5 ± 0,92	12,5 ± 0,92	13,0 ± 1,29	15,5 ± 2,05	17,0 ± 1,29	ріст
40 % спирт етиловий	18,5 ± 0,92	19,3 ± 1,52	13,5 ± 0,92	12,5 ± 0,92	13,3 ± 1,52	17,6 ± 0,80	12,3 ± 0,80
50 % спирт етиловий	17,6 ± 0,80	18,6 ± 0,80	13,6 ± 1,52	12,5 ± 0,92	13,3 ± 1,52	18,3 ± 2,0	12,3 ± 0,80
20,0 % розчин екстракту							
Вода	14,0 ± 1,30	14,0 ± 1,29	13,5 ± 2,05	ріст	ріст	17,5 ± 0,92	14,0 ± 1,29
ДМСО	14,6 ± 1,50	15,5 ± 0,92	16,5 ± 0,92	15,5 ± 0,92	15,6 ± 0,80	18,3 ± 2,0	13,5 ± 0,92
40 % спирт етиловий	16,5 ± 0,92	15,6 ± 1,52	12,5 ± 0,92	ріст	ріст	16,5 ± 0,92	ріст
50 % спирт етиловий	15,5 ± 0,92	15,5 ± 0,92	12,5 ± 0,92	ріст	ріст	15,6 ± 1,52	ріст
Контроль							
Вода	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст
ДМСО	13,5 ± 0,92	12,5 ± 0,92	11,5 ± 0,92	ріст	11,6 ± 0,80	14,0 ± 1,29	ріст
40 % спирт етиловий	12,6 ± 0,80	11,6 ± 0,80	11,6 ± 0,80	11,5 ± 0,92	11,5 ± 0,92	12,6 ± 1,52	ріст
50 % спирт етиловий	14,0 ± 1,29	11,6 ± 0,80	12,5 ± 0,92	11,6 ± 0,80	12,5 ± 0,92	13,5 ± 0,92	11,5 ± 0,92

Аналіз даних таблиці 2 свідчить, що екстракт з листя півників болотяних, одержаного за заявленим способом, проявляє антимікробну активність по відношенню до усіх тест-штамів мікроорганізмів. Діаметри зон затримки росту по відношенню до *S.aureus*, *E.coli* та *B.subtilis* складає 14-20 мм, що вказує на чутливість мікроорганізмів до екстракту. Досліджуваний екстракт виявив слабку антимікробну дію лише по відношенню до синьої палички та грибів. Найбільш виражену антимікробну активність проявляли екстракти розведені у ДМСО та спирті.

Приклад 4. Вивчення анаболічної активності екстракту з листя півника болотяного, одержаного за заявленим способом, проводились на моделі примусового плавання з навантаженням на статеву незрілих щурах [7]. Як інтегральні критерії анаболічної дії було обрано: приріст загальної маси тіла та литкового м'язу дослідних тварин по відношенню до інтактного контролю, вміст загального білка у тканинах внутрішніх органів та литкового м'язу, вміст сечовини у сироватці крові.

Досліди проводилися на білих нелінійних щурах масою $60,0 \pm 5,0$ г. Тварин поділили на 3 групи та протягом всього досліді (21 днів) утримували в умовах віварію на традиційному водно-харчовому раціоні. Групи тварин, характеризувалися таким чином: 1 група - інтактний контроль; 2 - тварини, що одержували екстракт, одержаний за заявленим способом, у дозі 150 мкг/кг; 3 - тварини, що одержували препарат порівняння, а саме калію оротат у дозі 100 мг/кг.

На 21-шу добу від початку експерименту всіх тварин зважували та виводили з експерименту шляхом декапітації під тиопентаноловим наркозом, після чого препарували та визначали масу внутрішніх органів (серця, печінки, нирок) та литкового м'язу. Основні біохімічні показники білкового обміну встановлювали за допомогою стандартних діагностичних наборів: загальний білок крові - біуретовим методом, сечовину крові та сечі за допомогою тест-набора Biotest, UREA 450, загальний білок у тканинах - методом Лоурі у модифікації Міллера. Результати представлені у таблиці 3.

Таблиця 3

Вивчення анаболічної активності екстракту з листя півників болотяних, одержаного за заявленим способом

Досліджуваний показник	Умови експерименту		
	Інтактний контроль	Екстракт листя півників болотяних, 150 мг/кг	Калію оротат, 100 мг/кг
1	2	3	4
Приріст маси тіла, г	20,7 \pm 1,4	29,9 \pm 1,9*	30,1 \pm 2,2*
Масовий коефіцієнт печінки, %	5,24 \pm 0,31	5,31 \pm 0,12	5,41 \pm 0,35
Масовий коефіцієнт серця, %	0,43 \pm 0,02	0,56 \pm 0,03	0,52 \pm 0,02
Масовий коефіцієнт нирок, %	1,011 \pm 0,05	1,13 \pm 0,026	1,01 \pm 0,024
Кількість білка у литковому м'язі, мг/100 мг тканини	54,0 \pm 3,0	85,5 \pm 4,4*	60,3 \pm 4,9
Кількість білка у серці, мг/100 мг тканини	48,1 \pm 4,0	74,0 \pm 5,0*	64,9 \pm 6,3
Сечовина у сироватці крові, ммоль/л	7,51 \pm 1,7	5,8 \pm 4,6*	6,9 \pm 2,2
Сечовина у сечі, ммоль/л	106,9 \pm 2,3	80,6 \pm 5,2**	95,8 \pm 1,9

Примітка: * $p \leq 0,05$, відхилення вірогідне по відношенню до контролю, ** $p \leq 0,05$, відхилення вірогідне по відношенню до препарату порівняння.

Одержані результати свідчать, що 21-денне застосування одержаного за заявленим способом екстракту з листя півників болотяних на моделі примусового плавання з вантажем у дозі 150 мг/кг викликає анаболічний ефект, який виявляється у достовірному збільшенні маси литкового м'язу і вмісту рівня білка в тканинах м'язу та серці. Під впливом досліджуваного засобу відмічається зниження вмісту сечовини у сироватці крові та у сечі по відношенню до контролю та препарату порівняння, що не прямо свідчить про стимуляцію білковосинтетичних процесів в організмі та підтверджує анаболічну активність.

Таким чином, заявлено новий спосіб одержання засобу рослинного походження з діуретичною, антимікробною та анаболічною активністю. Спосіб є простим у відтворенні, економічним, екологічно безпечним та може бути здійснений в умовах про-

мислового виробництва з використанням стандартного обладнання. Екстракт, одержаний за заявленим способом, проявляє виражену діуретичну, антимікробну та анаболічну активність і є перспективним для створення нових лікарських засобів для лікування та профілактики захворювань сечовидільної системи.

Джерела інформації:

1. Патент на винахід 77347, Україна, МПК (2006) A61K 36/185, A61K 127/00 (2007.01), A61P 29/00, A61P 31/00, A61P 13/00. Спосіб одержання засобу з протизапальною, антимікробною та діуретичною дією із листя груші. Заявка а200503996, заявл. 26.04.2005, опубл. 15.11.2006, Бюл. № 11.

2. Патент на изобретение 2123349, RU, МПК A61K35/78. Способ получения комплекса, обладающего противовоспалительным, иммуномодули-

руючим и антигипоксическим действием. Заявка 97106405/14, заявл. 18.04.1997, опубл. 20.12.1998.

3. Патент на корисну модель 33401, Україна, МПК (2006) А61К 36/48 (2008.01). Спосіб одержання біологічно активної субстанції рослинного походження з анаболічною дією. Заявка и200800470, заявл. 14.01.2008, опубл. 25.06.2008, Бюл. № 12.

4. Растительные ресурсы России и сопредельных государств: цветковые растения, их химический состав, использование: семейства

Butomaceae-Typhaceae. - СПб.: Наука, 1994. - С. 77-83.

5. Берхин Е.Б. Методы изучения влияния новых химических соединений на функцию почек // Хим.-фармац. журн. - 1977. - Т.П. - №5.-С 3-11.

6. Державна фармакопея України / МОЗ України. - 1-е вид. -Х.: 2001.-С.110-134.

7. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников. - Москва «МЕД-пресс-информ», 2004. - 924 с.