



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95568 (13) C2

(51) МПК (2011.01)

A61K 36/76 (2006.01)

A61P 17/00

A61P 29/00

A61P 25/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З АНТИМІКРОБНОЮ, ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ТА РЕПАРАТИВНОЮ АКТИВНІСТЮ

1

(21) а201006282

(22) 25.05.2010

(24) 10.08.2011

(46) 10.08.2011, Бюл.№ 15, 2011 р.

(72) РУДНИК АННА МИХАЙЛІВНА, ДЕРКАЧ НАТАЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА, КОВАЛЬОВ ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ, БОРОДІНА НАТАЛІЯ ВАЛЕРІЙВНА, МАЛОШТАН ЛЮДМИЛА МИКОЛАЇВНА
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(56) RU C1 2135201, 20.04.1998.

UA C2 73209, 25.06.2005.

RU C1 2104709, 20.02.1998.

RU C1 2179577, 20.02.2002.

RU C1 2322501, 20.04.2008.

(57) Спосіб одержання біологічно активних речовин з антимікробною, протизапальною та репара-

2

тивною активністю шляхом послідовного вилучення з рослинної сировини ліпофільного та фенольного комплексів, що включає екстракцію рослинної сировини хлорорганічним розчинником з наступним упарюванням витягу до вилучення розчинника і одержання ліпофільного комплексу, подальшу принаймні трикратну екстракцію висушеної знежиреної сировини при нагріванні екстрагентом, придатним для вилучення фенольного комплексу, упарювання об'єднаних екстрактів і сушіння, який відрізняється тим, що як рослинну сировину використовують бруньки тополі китайської (*Populus Simonii Carr.*), ліпофільний комплекс одержують при співвідношенні сировина : хлорорганічний розчинник 1:9-1:10, а фенольний комплекс екстрагують 50-65 % спиртом етиловим.

Винахід належить до фармації та медицини, а саме до способів одержання комплексів біологічно активних речовин переважно з антимікробною, протизапальною та репаративною активністю, виділених з рослинної сировини, зокрема бруньок тополі китайської.

Відомий спосіб одержання настойки тополі для лікування гнійно-запальних захворювань м'яких тканин [1]. Згідно з цим способом проводять настоювання бруньок тополі 65-96 % етиловим спиртом в умовах дрібної екстракції, яка полягає у настоюванні сировини при кімнатній температурі протягом 24 годин, подальшому вилученні цільових речовин з сировини при нагріванні не вище 80 °С протягом 1 години та об'єднанні першого та другого витягів. Одержують продукт у вигляді настойки на 80 % етиловому спирті. Спосіб було досліджено при використанні бруньок тополі духмяної, тополі чорної, тополі канадської, тополі лавролистої та тополі бальзамічної.

До недоліків наведеного способу можна віднести виділення з сировини лише тих біологічно активних речовин (БАР), які екстрагуються водно-

спиртовою сумішшю, залишаючи у відпрацьованій сировині цінні речовини ліпофільної природи. До того ж засіб у формі настойки на 80 % етиловому спирті, одержаний за відомим способом, не завжди доречний при зовнішньому застосуванні внаслідок виникнення ефекту печії, обумовленого високою концентрацією етилового спирту. Проблематично використання такого засобу при створенні препаратів у інших лікарських формах.

Відомий спосіб виділення БАР з кори осики, які виявляють антимікробну, репаративну, протизапальну, анагетичну та діуретичну активність [2]. Такий спосіб дозволяє одержати з сировини два біологічно активних комплекси: ліпофільний та фенольний. Перший одержують шляхом екстракції сировини хлорорганічним розчинником, зокрема хлороформом або хлористим метилом, у співвідношенні сировина:екстрагент 1:8 з наступним упарюванням фільтрату до видалення розчинника. Фенольний комплекс одержують шляхом екстракції сухої знежиреної сировини гарячою водою трічі по 30 хвилин при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 з подальшим об'єднанням вод-

(13) C2

(11) 95568

(19) UA

них екстрактів, упарюванням та сушінням. Вихід ліпофільного екстракту - 9,1 %, фенольного комплексу - 10,3 %.

Недоліком відомого способу можна вважати недостатньо високий вихід цільових продуктів, обумовлений неповним вилученням фенольних сполук з сировини внаслідок використання води як екстрагенту.

Задача винаходу полягає у створенні способу вичерпного вилучення БАР з комплексною фармакологічною активністю з бруньок тополі китайської, який завдяки заявленій сукупності ознак дозволяє одержати ліпофільний та фенольний комплекси БАР з високим промислово доцільним виходом, який більше, ніж вдвічі, перевищує вихід БАР за прототипом.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі одержання комплексу біологічно активних речовин з антимікробною, протизапальною та репаративною активністю шляхом послідовного вилучення з рослинної сировини ліпофільного та фенольного комплексів, що включає екстракцію рослинної сировини хлорорганічним розчинником з наступним упарюванням витягу до видалення розчинника і одержання ліпофільного комплексу, подальшому принаймні трикратну екстракцію висушеної знежиреної сировини при нагріванні екстрагентом, придатним для вилучення фенольного комплексу, упарювання об'єднаних екстрактів і сушіння згідно з винаходом передбачено, що як рослинну сировину використовують бруньки тополі китайської (*Populus Simonii* Carr.), ліпофільний комплекс одержують при співвідношенні сировина - екстрагент 1:9-1:10, а фенольний комплекс екстрагують 50-65 % спиртом етиловим.

Бруньки рослин роду тополя (*Populus L.*) широко використовують у народній та офіційній медицині. Бруньки тополі зареєстровані в Україні як офіційна сировина (номер реєстрації 74/684/6) з антисептичними, протизапальними властивостями та як засіб, що поліпшує живлення волосся [3].

Існують різні види тополь, листя та бруньки яких використовують з лікувальною метою, проте у літературних джерелах відсутня інформація про лікувальні властивості тополі китайської, яка широко культивується в Україні як декоративна рослина.

Авторами вперше було досліджено антимікробну, протизапальну та репаративну активність бруньок тополі китайської.

Всі ознаки заявленого способу були визначені дослідним шляхом.

Використання як першого екстрагенту хлорорганічного розчинника, переважно хлороформу, обумовлено найбільш повним вилученням ліпофільного комплексу з вибраного виду сировини. Інші знежирюючі розчинники, наприклад петролейний ефір, діетиловий ефір та інші, не забезпечують повне виділення ліпофільного комплексу з бруньок тополі китайської, при цьому існують суто технологічні недоліки використання таких розчинників: пари ефіру отруйні, горючі та вибухонебезпечні, при роботі з ними необхідно дотримуватись особливих умов безпеки. Крім того, ефір також відноситься до прекурсорів, стосовно яких встановлені заходи контролю.

Дослідним шляхом було визначено, що ефективне вичерпне вилучення ліпофільних речовин з бруньок тополі китайської досягається при співвідношенні сировина:хлороформ 1:9-1:10. Використання менших об'ємів розчинника призводить до зменшення виходу ліпофільного комплексу, а збільшення витрат розчинника понад зазначеного співвідношення є економічно недоцільним, бо не забезпечує підвищення виходу ліпофільного комплексу.

Експериментально був здійснений вибір сировини в залежності від фази вегетації тополі китайської. Результати дослідження динаміки накопичення ліпофільних сполук у бруньках тополі китайської в різні терміни заготівлі наведені у табл. 1.

Таблиця 1

Кількісний вихід ліпофільних сполук з бруньок тополі китайської у різні терміни заготівлі.

Місяць	Вересень	Жовтень	Листопад	Грудень	Січень	Лютий	Березень
Кількісний вихід ліпофільного екстракту, %	22,01	25,83	26,05	25,89	24,78	23,17	26,69

Як видно з таблиці, найбільша кількість ліпофільних сполук у бруньках тополі китайської накопичуються у березні, тому для одержання з бруньок тополі китайської комплексу БАР з протимікробною, протизапальною та репаративною активністю раціонально використовувати сировину, заготовлену саме у березні.

Експериментально встановлено, що використання як екстрагенту 50-65 % етанолу при одержанні фенольного комплексу з бруньок тополі китайської при нагріванні та трикратній екстракції забезпечує найбільш повну екстракцію фенольного комплексу.

Спосіб здійснюється таким чином. Повітряно-сухі бруньки тополі китайської, бажано заготовлені

у березні, вичерпно екстрагують хлороформом, при співвідношенні сировина:екстрагент 1:9-1:10. Отриманий екстракт фільтрують та упарюють при температурі 60-70 °С до повного видалення екстрагенту і одержання ліпофільного залишку. Знежирену сировину екстрагують 50-65 % етанолом, при температурі 60-80 °С тричі протягом 30 хвилин, при загальному співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 з наступним об'єднанням екстрактів, упарюванням та сушінням для одержання фенольного комплексу.

Одержаний ліпофільний комплекс бруньок тополі китайської являє собою мазеподібну масу гірчично-зеленуватого кольору зі специфічним характерним ароматним запахом; без зайвих

включень, однорідний, нерозчинний у воді, розчинний у 96 % етанолі, хлороформі, гексані, ацетоні, ДМСО, рослинних оліях.

Вихід продукту 26 %.

Фенольний комплекс з бруньок тополі китайської - гігроскопічний порошок коричневого кольору зі специфічним запахом, гіркий на смак, малорозчинний у воді, добре розчинний у 40-96 % етанолі, практично нерозчинний в ефірі, хлороформі.

Вихід продукту 17 %.

Заявлений спосіб забезпечує одержання з високим виходом ліпофільного та фенольного комплексів БАР з ефективною антимікробною, проти-запальною та репаративною активністю. Зазначені комплекси БАР можуть бути використані окремо або у суміші як діючі речовини при створенні препаратів у різних лікарських формах з відповідною фармакологічною дією.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1.

1,5 кг подрібнених повітряно-сухих бруньок тополі китайської, заготовлених у березні, вичерпно екстрагували хлороформом у співвідношенні сировина:екстрагент 1:9. Отриманий екстракт фільт-

рували та упарювали при температурі 65 °С до повного видалення екстрагенту і одержання ліпофільного залишку. Вихід ліпофільного комплексу склав 390 г (26 %). Знежирену сировину сушили до видалення хлороформу при кімнатній температурі. Суху знежирену сировину заливали 65 % етанолом у співвідношенні сировина-екстрагент 1:10, нагрівали на киплячому водяному нагрівнику протягом 30 хвилин, фільтрували. Процес повторювали ще двічі за аналогічних умов. Об'єднаний екстракт упарювали та висушували у ротаційно-вакуумному випарювачі при температурі 60 °С. Вихід фенольного комплексу склав 17 %.

Приклад 2.

Дослідження антимікробної активності ліпофільного комплексу, одержаного за заявленим способом, проводили *in vitro*, використовуючи стандартний метод дифузії в агар з набором еталонних штамів: *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Candida albicans* ATCC885-653.

Дані експерименту наведені у табл. 2.

Таблиця 2

Результати визначення протимікробної активності ліпофільного комплексу бруньок тополі китайської.

№ п/п	Штами мікроорганізмів	Діаметр зони затримки росту, мм
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	37,2±0,3
2	<i>Bacillus subtilis</i>	46,2±0,1
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23,4±0,2
4	<i>Escherichia coli</i>	18±0,1
5	<i>Candida albicans</i>	28,3±0,2

За даними таблиці 2, ліпофільний комплекс бруньок тополі китайської проявив достовірну антимікробну активність відносно всіх досліджуваних мікроорганізмів.

Приклад 3.

Дослідження протизапальної активності ліпофільного комплексу, одержаного за заявленим способом, проводили також на моделі термічного опіку лапи у мишей.

На цій моделі у тварин розвивається переважно ексудативне запалення. При опіках у зоні термічного ураження відбувається утворення великої кількості медіаторів запалення (гістамін, серотонін, кініни, оксиданти, метаболіти арахідонової кислоти, цитокініни та ін.), які є пусковим механізмом у розвитку локальних судинно-мезенхімальних змін, що є суттю запалення.

Дослід проводили на 24 білих мишах масою 18-20 г. Тварини були розділені на 4 групи по 6 тварин у кожній. Для створення патології у мишей викликали опік правої задньої лапи, шляхом занурення її у гарячу воду з температурою 66,5±0,5 °С

на 4 секунди. Після цього на опечену лапку тварин дослідної групи наносили ліпофільний екстракт бруньок тополі китайської. Тварин контрольної групи не лікували. Як препарати порівняння використовували мазі "Вундехіл" і "Алантан плюс".

Через 24 години тварин виводили з досліду і розраховували різницю у масі між набряклою і не набряклою лапами.

Протизапальну активність досліджуваних засобів визначали за формулою:

$$A = 100\% - \frac{(M_n - M_3) \cdot 100\%}{(M_{нк} - M_{зк})},$$

де:

A - антиексудативна активність, %;

M_n - маса набряклої лапи у досліді, мг;

M₃ - маса здорової лапи у досліді, мг;

M_{нк} - маса набряклої лапи у контролі, мг;

M_{зк} - маса здорової лапи у контролі, мг.

Результати дослідження наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Результати дослідження протизапальної активності ліпофільного комплексу бруньок тополі китайської, одержаного за заявленим способом, на моделі термічного опіку ($M \pm m$, $n=6$).

Об'єкт дослідження	Різниця у масі набряклої і ненабряклої лапи, мг	Протизапальна активність, %
Контроль	71,3 \pm 8,3	-
Мазь "Алантан плюс"	41,2 \pm 3,9*	42,1
Мазь "Вундехіл"	40,0 \pm 4,3*	38,6
Ліпофільний екстракт бруньок тополі китайської	11,5 \pm 2,2 ^{*/**}	72,1

Примітка: * - статистично достовірно у порівнянні з контролем.

** - статистично достовірно у порівнянні з препаратом порівняння.

Результати досліджень показали, що ліпофільний комплекс бруньок тополі китайської, одержаний за заявленим способом, виражено впливає на ексудативну фазу запалення. Пригнічення набряку, викликаного термічним опіком, відносно контролю склало 72,1 %, що перевищує за активністю препарати порівняння мазь "Вундехіл" на 33,5 % і мазь "Алантан плюс" на 30 %.

Одержані дані свідчать про виражену протизапальну дію ліпофільного екстракту бруньок тополі китайської на моделі термічного запалення у мишей.

Приклад 4.

Вивчення репаративної активності ліпофільного та фенольного комплексів, одержаних за заявленим способом, з бруньок тополі китайської проводили на 20 нелінійних статевозрілих щурах масою 200-230 г на моделі стандартної скарифікованої (трафаретної) рани. Критеріями оцінки репаративної активності були динаміка зміни площі поверхні ран та швидкість їх загоєння.

Тваринам під барбаміловим наркозом на попередньо поголену та оброблену 5 % розчином

йоду ділянку шкіри спини наносили рану за допомогою металічного скарифікатора діаметром 10 мм. Ліпофільний комплекс бруньок тополі китайської окремо і у поєднанні з фенольним комплексом (внутрішньошлунково) та препарат порівняння мазь "Вундехіл" наносили тваринам на рани щоденно, починаючи з другого дня (через 24 години) після моделювання ран. Експеримент припиняли після повного загоєння ран у групі тварин з контрольною патологією. Площу ран визначали кожні 3 дня. Швидкість загоєння ран розраховували за формулою:

$$V = \frac{(S - S_n) \cdot 100}{St},$$

де:

V - швидкість загоєння ран;

S - площа рани при попередньому вимірюванні;

S_n - площа рани при поточному вимірюванні;

St - кількість днів між вимірами.

Дані експерименту наведені у таблиці 4.

Таблиця 4

Результати визначення репаративної активності ліпофільного та фенольного екстрактів бруньок тополі китайської на моделі скарифікованих ран ($M \pm m$, $n=4$).

Умови досліджу	Термін дослідження, дні	Площа рани, мм ²	Загоєння рани, %
Контроль	Вихідні дані	78,5	-
	3	75,4	3,9
	6	56,7	27,8
	9	52,8	32,7
	12	30,2	61,5
	15	15,9	79,7
	18	2,8	96,4
	21	0	100
Мазь "Вундехіл"	Вихідні дані	75,8	-
	3	56,7	27,8
	6	50,3	35,9
	9	33,2	57,7
	12	23,8	69,7
	15	12,6	83,9
	18	0	100

Продовження Таблиці 4

Умови досліджу	Термін дослідження, дні	Площа рани, мм ²	Загоєння рани, %
Ліпофільний комплекс	Вихідні дані	78,5	-
	3	56,7	27,7
	6	38,5	50,9
	9	15,9	79,7
	12	1,3	98,3
	15	0,8	98,9
	16	0	100
Ліпофільний комплекс + фенольний комплекс	Вихідні дані	78,5	-
	3	50,3	35,9
	6	38,5	50,9
	9	8,0	89,8
	12	0,8	98,9
	13	0	100

В контрольній і дослідних групах загибелі тварин не було.

Спостереження за тваринами проводили щоденно. У всіх експериментальних тварин на другу добу дослідження спостерігали сухі рани з незначним набряком. У тварин контрольної групи на 6 добу площа ран зменшилась у 1,3 разу, а повне загоєння фіксували на 21 добу. Ліпофільний комплекс бруньок тополі китайської виявив виражену репаративну дію: на 6 добу площа ран зменшилась у 2 рази, на 12 добу - у 23 рази у порівнянні з групою контрольної патології і повне загоєння наступило на 16 добу. В групі, де тваринам поряд з ліпофільним комплексом додатково внутрішньошлунково вводили фенольний комплекс бруньок тополі китайської у дозі 50 мг/кг, загоєння відбувалось на 13 добу, тобто у 1,6 рази швидше, ніж у групі з контрольною патологією. У тварин, яких лікували препаратом порівняння маззю "Вундехіл" на 6 добу загоєння склало 35,9 %, а повне загоєння спостерігали на 18 добу.

Таким чином, заявлений спосіб вилучення БАР з бруньок тополі китайської з одержанням ліпофільного та фенольного комплексів з ефективною антимікробною, протизапальною та репара-

тивною дією, які можуть бути використані як окремо, так і разом як активна субстанція при створенні препаратів у різних лікарських формах.

Заявлений спосіб є економічно доцільним, технологічним, придатним для здійснення на стандартному обладнанні хіміко-фармацевтичних підприємств.

Спосіб має ряд переваг над аналогами:

1) забезпечує вичерпну екстракцію БАР з антимікробною, протизапальною та репаративною дією з бруньок тополі китайської;

2) дозволяє одержати дві лікарські субстанції: ліпофільний та фенольний комплекси, що дає можливість розширити перелік лікарських препаратів;

3) підвищує вихід цільових продуктів більше, ніж у 2 рази у порівнянні з аналогами.

Джерела інформації:

1. Патент на винахід 2135201, RU, МПК А61К35/78, заявл. 20.01.1998, опубл. 27.08.1999.

2. Патент на винахід 73209, UA, МПК 7 А61К35/78, заявл. 19.05.2003, опубл. 15.06.2005, Бюл. № 6.

3. Самура Б. А., Черных В. Ф., Банний И. П. и др. Фитотерапия в клинике внутренних болезней. Харьков, Изд-во НФаУ, 2003, С. 348.