



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **95690** (13) **C2**
(51) **МПК (2011.01)**
A61K 36/185 (2006.01)
A61P 7/10 (2006.01)
A61P 31/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ДІУРЕТИЧНОЮ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ДІЄЮ З ЛИСТЯ БЕРЕЗИ

1

(21) а200912704
(22) 07.12.2009
(24) 25.08.2011
(46) 25.08.2011, Бюл.№ 16, 2011 р.
(72) ХВОРОСТ ОЛЬГА ПАВЛІВНА, КИСЛИЧЕНКО
ВІКТОРІЯ СЕРГІЇВНА, ЯКОВЛЄВА ЛАРИСА ВА-
СИЛІВНА, ЧОРНА НАТАЛІЯ СТЕПАНІВНА
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ
(56) UA 8568 U, 15.08.2005
UA 27940 U, 26.11.2007
UA 19508 U, 15.12.2006
JP 10279490 A, 20.10.1998
Демина Л.Н., Паршикова В.Н., Степень Р.А. Био-
цидная активность CO₂-экстрактов листьев бере-
зы и смородины лесной и химический комплексы -
проблемы и решения// Всероссийская научно-
практическая конференция. - Красноярск, 9-10 но-

2

яб., 2006: Сборник статей по материалам конфе-
ренции. Т. 1. Красноярск. 2006, С. 169-172 [2009-
06 ВІОЗ БД ВИНІТИ]
Демина Л. Н., Паршикова В. Н., Степень Р. А. Сос-
тав, свойства и биоцидная активность углекислот-
ного экстракта листьев *Betula pendula* Roth // Изв.
вузов. Химия и хим. технол. 2006. 49, № 1, С. 75-
78, 135 [2007-09 СН20 БД ВИНІТИ]
(57) Спосіб одержання засобу з діуретичною та
протизапальною дією шляхом багаторазової екст-
ракції рослинної сировини спиртом етиловим при
кімнатній температурі з наступним об'єднанням та
упарюванням одержаних екстрактів, який **відріз-**
няється тим, що екстракції піддають листя берези
бородавчастої спиртом етиловим 70 % при спів-
відношенні сировини та екстрагенту 1:12-1:15 про-
тягом 12 годин.

Винахід належить до хіміко-фармацевтичної
промисловості, а саме до способів отримання
комплексів біологічно активних речовин з рослин-
ної сировини, зокрема з листя берези, з діуретич-
ною та протизапальною дією, які можуть бути ви-
користані у терапії захворювань нирок та
сечовидільних шляхів.

Проблема створення препаратів вищезна-
чених видів дії достатньо гостро стоїть перед віт-
чизняною охороною здоров'я, в зв'язку з чим по-
шук нових джерел біологічно активних речовин є
актуальним завданням.

Пріоритетним напрямком є вивчення і ство-
рення для лікування захворювань нирок фітопре-
паратів, перевагами яких є м'якість їх впливу на
організм, відсутність шкідливих побічних явищ і
ускладнень навіть при тривалому застосуванні.

Добре відомо, що діуретичну активність мають
водні настої та відвари з листя мучниці звичайної
та брусниці, у яких діючою речовиною є глікозид
арбутин [1].

Проте зазначені засоби не мають вираженої
протизапальної дії, до того ж використання листя
даних рослин є економічно невігідним через об-
межене поширення цих видів в Україні.

Відомий спосіб одержання комплексу біологіч-
но активних речовин з протимікробною та мем-
браностабілізуювальною дією [2] з листя ясен
звичайного.

Спосіб здійснюють наступним чином: подріб-
нені до розміру часточок 0,5-3,0мм листя ясен
завантажують в екстрактор, заливають 70% ета-
нолом до дзеркала, екстрагують протягом 1 годи-
ни, екстракт зливають у приймач. Екстракцію про-
водять ще двічі. Отримані екстракти (загальне
співвідношення сировина:екстрагент 1:15-1:20)
об'єднують, фільтрують та упарюють до густого
або сухого екстрактів. Екстракцію проводять при
температурі близько 90°C з використанням кипля-
чого водяного нагрівника або екстрактора з по-
двійним кожухом.

(13) **C2**

(11) **95690**

(19) **UA**

До недоліків відомого способу можна віднести проведення екстракції при високій температурі, що, з одного боку, призводить до руйнування термолабільних речовин, а з іншого - потребує додаткових витрат енергії. Засіб, одержаний за відомим способом, не має діуретичної дії.

Відомий спосіб одержання засобу з протизапальною, антимікробною та діуретичною дією з листя груші [3], згідно з яким сухе листя груші звичайної подрібнюють до розміру часток 3-5мм, закипають в екстракторі, заливають 10% спиртом етиловим при співвідношенні сировина:екстрагент 1:9-1:11, екстрагують при кімнатній температурі протягом 9-11 годин. Зливають одержаний екстракт. Процес повторюють 5-7 разів з використанням нових порцій екстрагенту до повного вилучення біологічно активних речовин з заданими активностями з сировини. Одержані екстракти об'єднують і упарюють до 1/18-1/20 попереднього об'єму. Одержують засіб у формі рідкого екстракту.

Проте, при реалізації відомого способу одержують засіб з помірною діуретичною дією, до того ж рідкий екстракт після відгонки спирту шляхом упарювання має короткий термін зберігання.

Задача винаходу полягає в створенні способу одержання засобу з діуретичною та протизапальною дією, який шляхом використання водно-спиртової екстракції листя берези бородавчастої при заданих параметрах забезпечує одержання засобу з вираженою лікувально-профілактичною дією, причому одержаний засіб може бути використаний як безпосередньо у формі густого екстракту, так і як лікарська субстанція для одержання препаратів у різних лікарських формах, ефективних при захворюваннях нирок і сечовивідних шляхів.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у спосіб одержання засобу з діуретичною та протизапальною дією шляхом багаторазової екстракції рослинної сировини спиртом етиловим при кімнатній температурі з наступним об'єднанням та упарюванням одержаних екстрактів, згідно з винаходом екстракції піддають листя берези бородавчастої спиртом етиловим 70% при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:12-1:15 протягом 12 годин.

Всі параметри заявленого способу визначені експериментальним шляхом.

Проведені авторами дослідження довели, що серед різних видів берез, що ростуть в Україні, найвищу діуретичну активність мають листя берези бородавчастої (*Betula pendula*).

Вибір у ролі екстрагенту спирту етилового зумовлений тим, що він має високу екстрагуючу здатність по відношенню до біологічно активних речовин (БАР) листя берези бородавчастої та, окрім того, є одним з широко застосовуваних та доступних реактивів фармацевтичного виробництва. Експериментальні дані з вибору виду екстрагенту наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Вибір виду екстрагенту
в залежності від виходу готового продукту

№ п/п	Вид екстрагенту	Вихід готового продукту, % від повітряно-сухої сировини
1.	Вода	21
2.	Спирт етиловий 30 %	16
3.	Спирт етиловий 70 %	25
4.	Спирт етиловий 96 %	5

Оптимальним за виходом готового продукту є спирт етиловий 70 %.

Таблиця 2

Вибір оптимального співвідношення сировина:екстрагент у залежності від виходу готового продукту

№ п/п	Співвідношення сировина:екстрагент	Вихід готового продукту, % від повітряно-сухої сировини
1.	1:5	8,5
2.	1:7	12,0
3.	1:10	14,0
4.	1:12	17,2
5.	1:15	24,5
6.	1:17	23,5
7.	1:20	24,0

Співвідношення сировина:екстрагент 1:12-1:15 є придатним для вибраної сировини та екстрагенту. Зменшення співвідношення призводить до зменшення виходу кінцевого продукту внаслідок неповного вилучення БАР, а збільшення співвідношення економічно недоцільне, бо не призводить до суттєвого збільшення виходу готового продукту.

Експериментальним шляхом було визначено, що оптимальна тривалість екстракції, з точки зору ефективного вилучення БАР з вибраної сировини є 12 годин.

Зменшення цього показника призводить до неповного вилучення БАР з рослинної сировини, а подовження - економічно недоцільне.

Визначено, що для вибраної сировини заданих параметрів заявленого способу, оптимальною є трикратна екстракція однієї порції сировини новими порціями екстрагенту при дотриманні сумарного співвідношення сировини до екстрагенту. Це забезпечує вичерпну екстракцію БАР з сировини.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином. Листя берези бородавчастої подрібнюють до розміру часток 0,5-1,0мм та екстрагують 70% етиловим спиртом при оптимальному співвідношенні сировина:екстрагент 1:12-1:15 при кімнатній температурі у три етапи, кожний з яких триває 12 годин. Одержані екстракти об'єднують, упарюють у вакуумі та сушать у вакуум-сушильній шафі до видалення залишків екстрагенту (остаточна вологість 6-25%). Вихід готового продукту за заявленим

способом складає понад 20%. Одержують готовий продукт у формі густого екстракту.

Спосіб ілюструється прикладами.

Приклад 1.

10кг подрібненого та просіяного крізь сито №1000 листя берези бородавчастої завантажують у екстрактор, заливають 112л 70% спирту етилового (з урахуванням коефіцієнту поглинання екстрагенту), екстрагують протягом 12 годин, екстракт зливають в приймач. Екстракцію проводять ще двічі порціями по 50л 70% спирту етилового. Отримані екстракти (загальне співвідношення сировина:екстрагент 1:15) обсягом 148л об'єднують, фільтрують та упарюють до густої консистенції (вологівміст 22,54%). Екстракцію здійснюють настоюванням при кімнатній температурі.

Вихід цільового продукту складає 20,56% від повітряносухої маси сировини.

Приклад 2.

Вивчення протизапальної дії засобу, одержаного за заявленим способом, проводили на моделі гострого ексудативного запалення стопи щурів, викликаного карагеніном [4], який обумовлює каскад запальних реакцій. Доведено, що у перші 30-90хв. розвитку набряку активно вивільняються гістамін і серотонін, в інтервалі між 1,5-2,5 годинами - кініні, а між 2,5-5,5 годинами - простагландини та лейкотрієни, що дозволяє опосередковано припускати механізми протизапальної дії досліджуваних речовин. Доведена пряма залежність між ефективністю препарату на моделі карагеніно-

вого запалення у щурів та його ефективності у клініці.

Досліди проводили на щурах масою 210-225г. Набряк викликали субплантарним введенням у праву задню лапу 0,1мл 1% розчину карагеніну фірми Serva. Досліджувані препарати вводили внутрішньо-шлунково одноразово за одну годину до індукування запалення лапи.

Засіб у формі густого екстракту з листя берези бородавчастої, одержаний за заявленим способом вводили внутрішньо-шлунково у дозі 7мг/кг. Препарат порівняння драже "Канефрон Н" (виробництво Біонорика ЛГ, Німеччина) вводили у дозі 20 мг/кг. Контрольна група щурів одержувала еквівалентну кількість розчинника (води). Розвиток набряку досліджували за збільшенням об'єму стопи, який вимірювали у динаміці протягом 6 годин за допомогою механічного онкометру за Л.С.Захаревським [9]. Рівень протизапальної дії оцінювали за антиексудативною активністю досліджуваних засобів.

Антиексудативну активність речовин виражали у % і визначали за здатністю зменшувати набряки у дослідних тварин у порівнянні з контрольними. Розрахунок проводили за формулою [4]:

$$A = (\Delta V_k - \Delta V_d / \Delta V_k) 100\%,$$

де

A - антиексудативна активність у відсотках;

ΔV_d і ΔV_k - різниця між набряклою та не набряклою стопами в досліді і в контролі.

Результати дослідження наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Динаміка протизапальної дії густого екстракту з листя берези бородавчастої і препарату порівняння "Канефрон Н" на моделі ексудативного карагенінового запалення стопи у щурів, (n=8)

Динаміка вимірювань	Контрольна група	Густий екстракт з листя берези бородавчастої, 7 мг/кг		Драже „Канефрон Н” 20 мг/кг	
	$\Delta V_k \left(\bar{X} \pm S \bar{x} \right)$	$\Delta V_d \left(\bar{X} \pm S \bar{x} \right)$	A, %	$\Delta V_d \left(\bar{X} \pm S \bar{x} \right)$	A, %
1 год.	17,5±0,63	13,0±1,30*	25,7	14,0±1,11	20,0
2 год.	26,88±1,37	17,75±1,81*	33,97	23,43±2,75	12,8
3 год.	32,75±1,16	25,0±2,07*	23,66	30,86±3,16	5,8
4 год.	33,25±1,60	27,63±1,46*	16,9	31,14±1,37	6,3
6 год.	23,13±1,25	22,25±1,39	3,8	23,63±1,35	-2,2

Примітки: * - відмінності достовірні щодо контрольної патології, p<0,05.

У результаті проведених досліджень впливу одноразового застосування густого екстракту з листя берези бородавчастої у дозі 7 мг/кг і в умовах гострого ексудативного запалення у щурів встановлено, що протягом перших двох годин після введення флоготропного агенту проявляється виражений антиексудативний ефект, який, починаючи з третьої години, дещо знижується і зникає на шосту годину. Препарат порівняння драже "Канефрон Н" не проявляє вираженого антиексудативного ефекту.

Таким чином, у результаті проведеного дослідження на моделі ексудативного запалення встановлена виражена протизапальна дія густого екстракту з листя берези бородавчастої, який перевершує за протизапальною дією препарат порівняння драже "Канефрон Н".

Приклад 3.

Діуретичну активність густого екстракту з листя берези бородавчастої, одержаного за заявленим способом, вивчали при спонтанному діурезі на тлі семиразового введення щурам.

Експеримент проводили на білих безпородних щурах масою 250-350г. Спочатку у тварин визначали спонтанний добовий діурез без введення препаратів. У сечі тварин визначали вміст креатиніну. У подальшому дослідженні щурам внутрішньошлунково протягом 7 днів вводили густий екстракт з листя берези бородавчастої (ГЕЛББ) у дозі 7мг/кг і препарат порівняння драже „Канефрон Н” виробництва Біонорика АГ (Німеччина) у дозі 20мг/кг. В останній день введення препаратів тварин помістили в обмінні клітки для збору добової

сечі. У тварин був вільний доступ до відстояної водопровідної води. Після цього вимірювали кількість добової сечі, визначили у ній вміст креатиніну. Екскрецію креатиніну розраховували за формулою [5]:

$$E_{\text{речовини}} = U_{\text{речовини}} \times V,$$

де:

$E_{\text{речовини}}$ - екскреція речовини;

$U_{\text{речовини}}$ - концентрація в сечі;

V - об'єм сечі. Результати досліджень представлені в таблиці 4.

Таблиця 4

Дослідження впливу густого екстракту з листя берези бородавчастої і препарату порівняння "Канефрон Н" на спонтанний діурез у щурів після семиразового введення

Виучувані показники	Вихідні дані групи ГЕЛББ	ГЕЛББ, 7мг/кг	Вихідні дані групи "Канефрон Н"	"Канефрон Н", 20 мг/кг
Кількість тварин в групі	10	10	10	10
Діурез, мл/на добу/100г	1,26±0,17	2,65±0,30*	1,43±0,25	2,83±0,0
Екскреція креатиніну, мкмоль/на добу/100г	2,46±0,45	4,43±0,78*	3,33±0,33	3,88±0,44

Примітки: * - достовірно по відношенню до вихідних даних кожної з груп, $p < 0,05$

Під впливом густого екстракту з листя берези бородавчастої і препарату порівняння „Канефрон Н” діурез достовірно підсилюється майже вдвічі у порівнянні з вихідними даними по групах, а рівень екскреції креатиніну з сечею достовірно збільшується тільки в групі тварин, які одержували густий екстракт з листя берези бородавчастої. Результати дослідження свідчать про діуретичну дію густого екстракту з листя берези бородавчастої.

Приклад 4.

Специфічну фармакологічну дію густого екстракту з листя берези бородавчастої вивчали на моделі діабетичної нефропатії у щурів на тлі цукрового діабету 1 типу, викликаного алоксаном.

Специфічну дію густого екстракту з листя берези бородавчастої (ГЕЛББ) вивчали на моделі діабетичної нефропатії на тлі цукрового діабету,

викликаного підшкірним введенням водного розчину алоксану з розрахунку 150 мг/кг [6]. Як препарат порівняння використовували драже „Канефрон Н” виробництва Біонорика А.Г. (Німеччина).

Дослідження проводили на 30 щурах самців 270-300 г. Алоксановий діабет характеризується нестабільним перебігом. Для досягнення більш стійкої патології [3-цитотоксин вводили підшкірно двічі з інтервалом в 5 діб. Досліджувані речовини - густий екстракт з листя берези (7 мг/кг) та препарат порівняння „Канефрон Н” (20 мг/кг) вводили внутрішньошлунково тваринам відразу після ін'єкції алоксану, і надалі протягом місяця. Після цього визначали в крові щурів цукор, креатинін, сечовину. Розраховували швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ).

Результати дослідження наведені у таблиці 5.

Таблиця 5

Дослідження специфічної фармакологічної дії густого екстракту з листя берези бородавчастої при діабетичній нефропатії у щурів на тлі цукрового діабету I типу, викликаного алоксаном

Група	Інтактний контроль	Контрольна патологія	ГЕЛББ, 7 мг/кг	Канефрон, 20 мг/кг
n	6	10	10	10
Маса тварин, г	293,3±11,9	250,6±10,2	297,5±12,5	280,6±14,3
Цукор у крові, моль/л	3,42±0,22	15,15±1,88*	4,97±0,48**	4,93±0,82**
Креатинін у крові, мкмоль/л	86,28±4,18	131,42±7,00*	75,71±5,66**	87,17±8,34**
Сечовина у крові, моль/л	7,50±0,37	11,50±1,16*	7,64±0,39**	9,09±0,96
ШКФ, мл/мип/100г	0,194±0,030	0,095±0,021	0,184±0,037	0,215±0,033

Примітки: * - відхилення вірогідне щодо інтактного контролю, $p < 0,05$;

** - відхилення вірогідне щодо контрольної патології, $p < 0,05$

Результати дослідження показали, що щури з групи контрольної патології у середньому втрачали масу тіла. Рівень цукру у крові більше ніж у 4 рази перевищував рівень цукру у крові у тварин інтактного контролю. У сироватці крові зафіксували високий рівень продуктів азотистого обміну - креатиніну і сечовини. У тварин з групи контрольної патології ШКФ була в середньому нижча, ніж у тварин інтактного контролю, але цей показник не мав достовірного характеру.

Під впливом густого екстракту з листя берези бородавчастої у кінці експерименту маса щурів була на рівні інтактного контролю. Рівень концентрації у крові цукру, креатиніну і сечовини достовірно знизився у порівнянні з групою щурів контрольної патології. ШКФ була на рівні інтактного контролю.

Введення щурам препарату порівняння "Канефрон Н" також сприяло підвищенню маси тіла тварин у кінці експерименту. У сироватці крові рівень креатиніну і цукру достовірно знизився у порівнянні з групою щурів контрольної патології, а рівень сечовини був дещо завищеним по відношенню до інтактного контролю, але цей показник не мав достовірного характеру. ШКФ під впливом таблеток канефрону у середньому дещо збільшилася у порівнянні до інтактного контролю.

Таким чином, дані експерименту вказують на позитивний вплив досліджуваних препаратів на розвиток діабетичної нефропатії.

Таким чином, заявлений новий спосіб одержання засобу з діуретичною та протизапальною дією, який є нетоксичним, не має шкідливої токсичної дії, придатний до тривалого застосування при лікуванні захворювань нирок і сечовидільних шляхів.

Заявлений спосіб простий, економічний, передбачає використання доступної вітчизняної сировини та екологічно безпечних реактивів, може бути здійснений на будь-якому фармацевтичному підприємстві зі стандартним обладнанням. Комплекс БАР, одержаний заявленим способом, може бути використаний як лікарський засіб у формі густого екстракту або як лікарська субстанція для створення препаратів у різних лікарських формах.

Джерела інформації:

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Пособие для врачей в двух томах. 14-е издание, Москва, ООО "Новая волна", Издатель Дивов С.Б., 2002, Т.1, С.491-492.

2. Патент на винахід 79873, Україна, МПК А61К36/63 (2007.01) А61Р31/04 (2007.01) А61Р31/10 (2007.01), заявл. 13.10.2005, опубл. 25.07.2007, Бюл. №11.

3. Патент на винахід 77347, Україна. МПК (2006) А61К36/185, А61К127/00 (2006.01), А61Р29/00, А61Р31/00, А61Р13/00, заявл. 26.04.2005, опубл. 15.11.2006, Бюл. №11.

4. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) /за редакцією О.В.Стефанова. - К.: Авіцена, 2001. - 528с.

5. Гоженко А.І., Куксань Н.І., Погоріла І.В. Функціональний стан нирок при хронічній блокаді синтезу оксиду азоту в щурів// Медична хімія. - 2002. - Т.4. - №4. - С.65-68.

6. Волчегорский И.А., Колесников О.Л., Цейлиман В.Э., Колесникова Л.А., Владимиров Л.К. Влияние обзидана (пропранолола) и пирогенала на проявления аллоксанового диабета у крыс// Проблемы эндокринологии. 1997. - Т.43. - №2. - С.38-41.