



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 96621

(13) C2

(51) МПК

A61K 36/73 (2006.01)

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОЛІФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ З АНТИМІКРОБНОЮ, ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ТА АНТИОКСИДАНТНОЮ ДІЄЮ

1

2

(21) а200908921

(22) 27.08.2009

(24) 25.11.2011

(46) 25.11.2011, Бюл.№ 22, 2011 р.

(72) КОЗИРА СОФІЯ АНДРІЇВНА, СЕРБІН АНАТОЛІЙ ГАВРИЛОВИЧ, КУЛАГІНА МАРІЯ АНДРІЇВНА, РАДЬКО ОЛЕНА ВІКТОРІВНА, ВОРОНІНА ЛАРИСА МИКОЛАЇВНА, ОСОЛОДЧЕНКО ТЕТЯНА ПАВЛІВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(56) RU C2 2174011, 27.09.2001

UA U 9940, 17.10.2005

UA A 59681, 15.09.2003

UA A 69626, 15.09.2004

(57) Спосіб одержання поліфенольного комплексу з антимікробною, протизапальною та антиоксидантною дією шляхом екстракції рослинної сировини 50 % спиртом етиловим з подальшим упарюванням, фільтрацією та сушінням, який **відрізняється** тим, що принаймні трикратній екстракції піддають кореневища гравілату міського *Geum urbanum* при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:(9 -11) протягом 13-15 годин, після чого сировину додатково промивають екстрагентом у кількості до 40 % від заданого співвідношення, а зливи об'єднують з сумарним екстрактом.

Винахід належить до хіміко-фармацевтичної промисловості, зокрема до способів отримання біологічно активних речовин з рослинної сировини.

У сучасній медичній практиці широко використовуються біологічно активні засоби природного походження. Лікарські препарати на основі рослинної сировини виглядають дуже привабливими завдяки низці позитивних властивостей:

максимальній спорідненості до організму людини, більшою безпечністю відносно побічної дії, незначною алергійністю і токсичністю, можливістю тривалого використання без формування звикання.

Біологічна активність рослинної сировини значною мірою обумовлена кількісним та якісним вмістом поліфенольних сполук.

Відомий спосіб одержання комплексу поліфенольних сполук з протизапальною, кардіопротекторною та антиоксидантною дією [1]. Спосіб полягає в екстракції трави чини весняної 50 % спиртом етиловим при співвідношенні сировини : екстрагент 1:7 протягом 47 годин з наступним упарюванням одержаного екстракту до 1/7-1/8 попереднього об'єму, обробкою упареного екстракту спиртом етиловим, відокремленням надосадової рідини, її упарюванням і сушінням.

Недоліком наведеного способу можна вважати його відносно високу тривалість.

Відомий також спосіб одержання суми поліфенолів з антимікробною, протизапальною та діуретичною активністю [2] шляхом екстракції 70 % спиртом етиловим суцільної душечки зеленої (*Duschekia viridis*) протягом 13-15 годин при співвідношенні сировини : екстрагент 1:9-1:11 з подальшим упарюванням до водного залишку, фільтрацією, обробкою етилацетатом у співвідношенні сумарний екстракт : етилацетат 1:2.

Недоліком наведеного способу можна вважати використання токсичного екстрагенту етилацетату.

Найближчим до заявленого є спосіб одержання поліфенольного комплексу «Флавітін» з протизапальною, анальгетичною, противиразковою та антиоксидантною активністю [3] шляхом екстракції 50 % спиртом етиловим листя винограду, краще сорту Дабуги, при співвідношенні сировини : екстрагент 1:10 з подальшим упарюванням до водного залишку, фільтрацією, ресорбцією фенольних сполук з осаду водою, об'єднанням фільтрату з одержаним водним розчином, упарюванням і сушінням.

Наведений спосіб дозволяє одержати поліфенольний комплекс з широким спектром фармакологічної дії, проте використана рослинна сировина не є загальнодоступною, ареал її розповсюдження обмежений субтропічною зоною. Крім того, до спектра фармакологічної активності одержаного екстракту не входить антимікробна дія.

Задачею винаходу є створення способу одержання суми поліфенолів з рослинної сировини, який шляхом спиртової екстракції кореневища

(13) C2

(11) 96621

(19) UA

гравілату міського *Geum urbanum* при заданих параметрах способу забезпечує одержання екстракту з вираженою антимікробною, протизапальною та антиоксидантною активністю.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі одержання поліфенольного комплексу з антимікробною, протизапальною та антиоксидантною дією шляхом екстракції рослинної сировини 50 % спиртом етиловим з подальшим упарюванням, фільтрацією та сушінням винаходом передбачено, що принаймні трикратній екстракції піддають кореневища гравілату міського *Geum urbanum* при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:(9-11) протягом 13-15 годин, після чого сировину додатково промивають екстрагентом у кількості до 40 % від заданого співвідношення, а зливи об'єднують з сумарним екстрактом.

Як сировину вибрано кореневище гравілату міського *Geum urbanum* родини розові, який широко розповсюджений на всій території України.

Саме вибір рослинної сировини у поєднанні з параметрами заявленого способу обумовлює одержання кінцевого продукту з необхідним спектром

фармакологічних властивостей, дозволяє розширити арсенал існуючих біологічно активних речовин, придатних до одержання лікарських засобів у різних лікарських формах, надаючи тим самим можливість індивідуального підходу до лікування хворих.

У народній медицині існують окремі відомості про помірну антимікробну або протизапальну активність відварів гравілату міського [4].

Авторами вперше було виявлено антиоксидантну дію суми поліфенолів кореневища *Geum urbanum*, одержаних заявленим способом.

Вибір як екстрагенту спирту етилового було здійснено експериментальним шляхом, виходячи з умов максимальної екстракції поліфенольних сполук з вибраної сировини. Оптимальним екстрагентом для заявленого способу є 50 % спирт етиловий.

У процесі досліджень були визначені також співвідношення сировини до екстрагенту і час екстракції. Дані експериментів наведено у таблицях 1-2.

Таблиця 1

Визначення оптимального співвідношення сировина : екстрагент при екстракції кореневищ гравілату міського 50 % спиртом етиловим у відповідності з заявленим способом

№ досліджу	Співвідношення сировина: екстрагент	Вихід готового продукту, %	Вихід діючих речовин, %
1	1:5	17,8	38,45
2	1:9	18,1	41,55
3	1:10	19,7	42,55
4	1:11	19,6	42,45
5	1:12	19,6	42,45

Згідно з даним експерименту ефективним інтервалом співвідношення сировини до екстрагенту є 1:9 - 1:11. При зменшенні цього співвідношення зменшується як вихід готового продукту, так і вихід діючих речовин. Збільшення

співвідношення недоцільне, тому що показники виходу практично не змінюються, а витрати спирту етилового зростають. Оптимальним є співвідношення сировини до екстрагенту як 1:10.

Таблиця 2

Визначення оптимального часу екстракції кореневищ гравілату міського 50 % спиртом етиловим в співвідношенні сировина : екстрагент 1:10

№ досліджу	Час екстракції, години	Вихід готового продукту, %	Вихід діючих речовин, %
1	12	18,0	39,55
2	13	18,2	41,35
3	14	19,7	42,55
4	15	19,6	42,55
5	16	19,6	42,55

Аналіз даних табл. 2 свідчить, що ефективним інтервалом часу екстракції є 13-15 годин. Зменшення цього часу не дозволяє вичерпно екстрагувати поліфенольні сполуки з сировини. Збільшення - не забезпечує зростання показників виходу готового продукту і діючих речовин, та є економічно недоцільним. Оптимальний час екстракції - 14 годин.

Експериментальним шляхом визначено, що

додаткове промивання сировини (після екстракції та зливу одержаного екстракту) екстрагенту у кількості 40 % від використаного при екстракції дозволяє збільшити відсоток екстрактивних речовин, які обумовлюють фармакологічну дію.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином: кореневище гравілату міського подрібнюють до розміру частин 0,5-1,0 мм, принаймні трикратно екстрагують 50 % спиртом етиловим у співвід-

ношенні сировина : екстрагент 1:9 - 1:11 протягом 13-15 годин, сировину додатково промивають екстрагентом, об'єднують всі зливи з подальшим упарюванням одержаного екстракту до видалення екстрагенту, фільтрацією та сушінням. Вихід готового продукту 19,7 %.

Одержаний продукт - негігроскопічний аморфний порошок світло-коричневого кольору зі специфічним характерним запахом, розчинний у воді, в 50 % етанолі при нагріванні, слабозрозчинний у хлороформі, етилацетаті та ефірі.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1

2,0 кг подрібнених (подрібненість 0,5-1 мм) кореневищ *Geum urbanum* екстрагували 10 л 50 % спирту етилового в типовому екстракторі ємністю 15 л з мішалкою та несправжнім дном протягом 14 годин. Екстракт в об'ємі 5 л зливали, а сировину промивали 2 л 50 % етилового спирту. Екстрагування проводили за тими ж умовами ще двічі новими порціями екстрагенту, додаючи кожного разу 5 л 50 % спирту етилового, зливаючи 6 л екстракту і промиваючи сировину 2 л 50 % спирту етилового. Усі зливи об'єднували та упарювали до повного вилучення спирту. Об'єм кубового залишку становив 3 л. Для вилучення смолистих речовин, які випадають при упарюванні (випадає 50 г, що складає 3,3 % від ваги

завантаженої сировини), сумарний екстракт фільтрували через нутч-фільтр. Очищений екстракт висушували у вакуумному апараті при температурі 35 ± 5 °C і розрідженні 550 ± 5 мм рт. ст. до сухого залишку. Отримали 295,5 г сухого цільового продукту, що у перерахунку на повітряно-суху сировину складає 19,7 %.

Дослідження біологічної активності поліфенольного комплексу, одержаної запропонованим способом, були проведені *in vitro* та *in vivo* і довели, що одержані за заявленим способом поліфенольні сполуки мають виражену антимікробну, протизапальну та антиоксидантну дію.

Приклад 2

Для вивчення антимікробної активності поліфенольного комплексу, одержаної за заявленим способом, був використаний метод дифузії в агар. Для оцінювання активності застосовували рекомендовані ВООЗ штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Escherichia coli* 25922 ATCC, *Proteus vulgaris* 4636 ATCC, *Proteus aeruginosa* 27853 ATCC та *Candida albicans* 885/653 ATCC.

Визначення антимікробної активності досліджуваного поліфенольного комплексу проводили методом дифузії в агар. Як препарат порівняння було вибрано "Новоіманін". Результати дослідження наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Вивчення антимікробної активності полі фенольного комплексу кореневища гравілату міського методом дифузії.

Варіант досліджу	Діаметр зон затримки мікроорганізмів в мм ± мм				
	Тест-культура мікроорганізмів				
Поліфенольний комплекс	S.aureus 25923 ATCC	E.coli 25922 ATCC	P.vulgaris 4636 ATCC	P.aeruginosa 27853 ATCC	C.albicans 885/653 ATCC
	22,8±1,4	20,3±1,2	19,6±0,7	17,2±0,6	18,2±0,6
Новоіманін	16,1±1,2	15,2±0,6	14,5±0,8	12,5±1,1	11,2±0,8

Аналіз даних таблиці 3 свідчить про виражену антимікробну дію поліфенольного комплексу, отриманого з кореневища гравілату міського заявленим способом, що перевищує дію препарату порівняння.

Приклад 3

Протизапальну активність поліфенольного комплексу, одержаного за заявленим способом, вивчали на моделі гострого запального набряку, викликаного субплантарним введенням у задню лапу щура 0,1 мл 1 % розчину карагеніну. Об'єм лапи вимірювали за допомогою онкометра до початку досліджу та у момент максимального розвитку набряку (4 години). Поліфенольний комплекс та препарат порівняння ортофен у дозі 8

мг/кг вводили у шлунок тварин відповідних дослідних груп за 30 хвилин до введення флогогенного агента. Контрольна група тварин одержувала еквівалентну кількість води. Протизапальну активність розраховували за формулою, запропонованою Ф.П. Трінусом:

$$A = \frac{U_k - U_o}{U_k} \times 100, \text{ де}$$

A - протизапальна активність, %

Uк і Uо відповідно об'єм лапи у контролі та у досліді.

Результати досліджу представлені в табл. 4.

Таблиця 4

Протизапальна активність поліфенольного комплексу у порівнянні з ортофеном (n = 7)

Показник / група	Контроль	Ортофен, 8 мг/кг	Сума поліфенолів, 50 мг/кг
Величина набряку, ум. одиниць	13,75±1,11	3,25±0,75*	6,25±0,25*/**
Протизапальна активність, %	-	76,4	54,5

Примітка. * - вірогідність розходжень при $p < 0,05$ у порівнянні з контролем** - вірогідність розходжень при $p < 0,05$ у порівнянні з ортофеном

Таким чином, у досліді сума поліфенолів найбільшу протизапальну активність проявляла у дозі 50 мг/кг, яка викликала пригнічення розвитку експериментального набряку лап у білих щурів на 54,5 % за ступенем протизапальної активності.

Приклад 4

Антиоксидантні властивості поліфенольного комплексу з кореневищ гравілату міського, одержаного за заявленим способом, вивчали на моделі спонтанного перекисного окислення ліпідів у залежності від концентрації екстракту.

Наважку печінки використовували для приготування 25 % гомогенату на 0,1 М трис-хлоридному буфері (рН = 7,0). Досліджуваний поліфенольний комплекс додавали до гомогенату в концентраціях 0,137, 0,279 та 0,548 мг/мл гомогенату. Свіжоотримані суміші по 0,2 мл вносили у пробірки з 3 мл трис-хлоридного буферу (рН = 7,4). Як препарат порівняння використовували силібор, який додавали до середовища інкубації

в концентрації 0,137 мг/мл гомогенату. Інкубацію проводили при температурі 37 °С протягом 15 хвилин. Реакцію зупиняли шляхом додавання 1,5 мл 40 % розчину кислоти трихлороцтової, після чого в інкубаційному середовищі проводили визначення ТБК-активних продуктів. Визначення вмісту ТБК-реактивних в інкубаційному середовищі проводили за допомогою реакції з кислотою тіобарбітуровою з подальшим фотокалориметруванням при довжині хвилі 532 нм.

Розрахунок концентрації екстракту в інкубаційному середовищі проводили з урахуванням його кількості, яка надходить через систему ворітної вени до печінки при одноразовому введенні досліджуваної суми поліфенолів у дозах 25, 50 та 100 мг/кг. Аналогічним чином розраховували концентрацію препарату порівняння, яка відповідає дозі 25 мг/кг.

Результати проведених досліджень наведені у табл. 5.

Таблиця 5

Антиоксидантна активність поліфенольного комплексу у порівнянні з силібором (n = 3).

Група	Е	С (мкмоль/л)	С _{ср.знач.} (мкмоль/л)	АОА (%)
Контроль	0,580 0,640 0,640	3,72 4,10 4,10	3,97±0,13	-
Поліфенольний комплекс 0,548 мг/мл	0,135 0,115 0,105	0,87 0,74 0,67	0,76±0,06*/**	80,8
Поліфенольний комплекс 0,279мг/мл	0,180 0,190 0,225	1,15 1,25 1,44	1,28±0,09*/**	67,8
Поліфенольний комплекс 0,137мг/мл	0,430 0,450 0,440	2,76 2,88 2,82	2,82±0,03*/**	29,0
Силібор 0,137 мг/мл	0,345 0,315 0,330	2,29 2,02 2,12	2.11±0,03*	46,9

Примітка: * - вірогідність розходжень за відношенням до контролю ($p \leq 0,05$);** - вірогідність розходжень за відношенням до силібору ($p \leq 0,05$);

n - кількість проб в кожній серії;

Е - оптична густина;

С - концентрація ТБК активних продуктів в інкубаційному середовищі,

АОА - антиокислювальна активність.

Дані, отримані в експерименті, свідчать, що поліфенольний комплекс у формі сухого екстрак-

ту кореневища гравілату міського, одержана за заявленим способом, має виражені антиоксидан-

тні властивості. Було встановлено, що при внесенні до інкубаційного середовища у концентрації 0,137 мг/мл досліджуваний екстракт зменшує накопичення ТБК-активних продуктів на 29,0 %. При збільшенні концентрації екстракту до 0,279 мг/мл антиоксидантний ефект посилювався і складав 67,8 %, у концентрації 0,548 мг/мл екстракт кореневища гравілату міського зменшував накопичення ТБК-реактантів на 80,8 %. У той же час силібор, який додавали до інкубаційного середовища в концентрації 0,137 мг/мл, зменшував накопичення продуктів перекисного окислення ліпідів на 46,9 %.

Таким чином, за даними експерименту встановлено, що досліджений поліфенольний комплекс, одержаний за заявленим способом, проявляє виражену антиоксидантну дію, що перевищує дію препарату порівняння.

Експериментальними дослідженнями гострої токсичності поліфенольного комплексу, одержаного за заявленим способом, доведено, що відповідно до класифікації К. К. Сидорова її можна віднести до практично нетоксичних речовин.

Таким чином, заявлено спосіб одержання поліфенольного комплексу з доступної сировини - кореневищ гравілату міського з вираженою антимікробною, протизапальною та антиоксидантною активністю. Спосіб може бути здійснений у промислових умовах фармацевтичного підприємства

на стандартному обладнанні. Одержаний за заявленим способом продукт відзначається широким спектром фармакологічної дії, нетоксичний, не алергійний, стійкий при зберіганні (термін зберігання 3 роки) і може бути використаний як субстанція для створення лікарських препаратів у різних лікарських формах.

Джерела інформації

1. Деклараційний патент 69626А, Україна, МПК7 А61К 35/78. Спосіб одержання комплексу поліфенольних сполук з протизапальною, кардіопротекторною та антиоксидантною дією. Заявка 2003109473, заявл. 21.10.2003, опубл. 15.09.2004, Бюл. № 9.

2. Патент 76063, Україна А 61К36/185. Спосіб одержання суми поліфенолів з антимікробною, протизапальною та діуретичною активністю. Заявка 200500114, заявл. 04.01.2005, опубл. 15.06.2006, Бюл. № 6.

3. Деклараційний патент 59681А, Україна, МПК7 А61К 35/78. Спосіб одержання поліфенольного комплексу «Флавітін» з протизапальною, анальгетичною, противиразковою та антиоксидантною дією. Заявка 2002119121, заявл. 15.11.2002, опубл. 15.09.2003, Бюл. № 9.

4. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / відп. ред. А.М. Гродзінський.- К.: Вид-во «Українська Радянська Енциклопедія» ім. М.П. Бажана, 1992. - С. 276-277.