



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85782 (13) C2  
(51) МПК (2009)  
A01N 65/48  
A61K 36/906 (2008.04)  
A61P 31/10 (2008.04)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ СКЛАДУ ДЛЯ МІСЦЕВОГО НАНЕСЕННЯ, ЩО МІСТИТЬ ЕКСТРАКТ РОСЛИНИ *HEDYCHIUM SPICATUM*, ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОЇ ГРИБКОВОЇ ХВОРОБИ ШКІРИ

1

(21) а200709732  
(22) 17.06.2005  
(24) 25.02.2009  
(86) РСТ/IB2005/051997, 17.06.2005  
(31) 101/MUM/2005  
(32) 02.02.2005  
(33) IN  
(46) 25.02.2009, Бюл.№ 4, 2009 р.  
(72) ЧАУХАН ВІДЖЕЙ СІНГХ, САТІАН КАЛКУН-ТЕ С., КАДАМ КАВІТА П.  
(73) НІЧОЛАС ПІРАМАЛ ІНДІЯ ЛІМІТЕД  
(56) US 2002/0155138 A1, 24.10.2002  
GUPTA S.K. ET AL: 'Isolation of Ethyl p-methoxycinnamate, the major antifungal principle of *Curcumba zedoaria*' LLOYDIA vol. 39, no. 4, July 1976 - August 1976, pages 218 - 222  
US 2004/0007284 A1, 15.01.2004  
(57) 1. Застосування складу для місцевого нанесення для лікування інфекційної грибової хвороби шкіри, причому вказаний склад містить ефективну кількість екстракту рослини *Hedychium spicatum* і фармацевтично прийнятний носій.  
2. Застосування за п. 1, яке відрізняється тим, що вказаний екстракт одержують з кореневих рослин *Hedychium spicatum*.  
3. Застосування за п. 1 або п. 2, яке відрізняється тим, що екстракт у вказаному складі передбачений у кількості 0,1-20мас. %.  
4. Застосування за п. 3, яке відрізняється тим, що екстракт у вказаному складі передбачений у кількості 2,5-10мас. %.  
5. Застосування за п. 1 або п. 2, яке відрізняється тим, що вказаний екстракт містить ефективну кількість діючої речовини, етил-р-метоксицинамат.  
6. Застосування за п. 5, яке відрізняється тим, що етил-р-метоксицинамат присутній у кількості 4-10мас. %.

2

7. Застосування за п. 6, яке відрізняється тим, що етил-р-метоксицинамат присутній у кількості 6-8мас. %.  
8. Застосування за п. 1, яке відрізняється тим, що вказаний склад для місцевого нанесення виготовлений у вигляді мазі.  
9. Застосування за п. 1, яке відрізняється тим, що вказаний склад для місцевого нанесення виготовлений у вигляді крему.  
10. Застосування складу для місцевого нанесення для лікування запалення, пов'язаного з інфекційною грибовою хворобою шкіри, причому вказаний склад містить ефективну кількість екстракту рослини *Hedychium spicatum* і фармацевтично прийнятний носій.  
11. Застосування за п. 1, яке відрізняється тим, що вказана композиція додатково містить принаймні один другий компонент, вибраний з групи, яка складається з протигрибового трав'яного екстракту, протизапального засобу й інгібітора меланогенезу.  
12. Спосіб лікування інфекційної грибової хвороби шкіри, причому вказаний спосіб включає місцеве нанесення трав'яного складу, який містить ефективну кількість екстракту *Hedychium spicatum* і фармацевтично прийнятний носій.  
13. Спосіб за п. 12, який відрізняється тим, що інфекційна грибова хвороба шкіри викликана грибами *Trichophyton mentagrophytes* або грибами *Microsporum gypseum*.  
14. Спосіб за п. 12, який відрізняється тим, що вказаний склад містить екстракт *Hedychium spicatum* у кількості 0,1-20мас. %.  
15. Спосіб за п. 14, який відрізняється тим, що вказаний склад містить екстракт *Hedychium spicatum* у кількості 2,5-10мас. %

Цей винахід відноситься до нової трав'яної композиції, яка має протидерматофітну дію, ефективної проти інфекційних грибових хвороб шкіри, яка містить як основний інгредієнт рослинну речовину. Крім того, винахід відноситься до способу

виготовлення і способу лікування пацієнта, який має інфекційну грибову хворобу шкіри і реакції у вигляді свербіжів й запалення за таких інфекційних станів. Зокрема, цей винахід відноситься до протидерматофітної композиції, ефективної проти

(19) UA (11) 85782 (13) C2

інфекційних грибкових хвороб шкіри, в якій використовується екстракт, одержаний з рослини *Neduchium spicatum*, який містить як основну діючу речовину етил-р-метоксицинамат, факультативно, у сполученні з іншими біологічно активними речовинами, такими, як інші протидерматофіти й інгібітори меланогенезу.

Тіло зазвичай служить господарем самим різноманітним бактеріям і грибкам. Більшість часу підтримується баланс між тілом як господарем і мікроорганізмами. Іноді, однак, виникають умови, які дозволяють цим мікроорганізмам переважити цей баланс, спричиняючи при цьому інфекційне захворювання.

Мільйони людей в усьому світі піддаються діянню поверхневих грибкових інфекцій, якими є найпоширеніші хвороби шкіри. Ці інфекції, які мають місце як у здорових, так й у імунологічно ризикових (що мають недостатній імунітет внаслідок імунодефіцитного захворювання або дії імуносупресорів) осіб, викликаються дерматофітами, дріжджами й недерматофітною плісінню. Деякі поверхневі грибкові інфекції шкіри викликаються дерматофітами, які відносяться до родів *Trichophyton* (патогенні гриби - збудники дерматофітозів), *Microsporum* (патогенні гриби - збудники дерматомікозів) і *Epidemophyton* (паразитичні гриби, не здатні уражати волоссяні фолікули). Ці схожі на плісень гриби добре розвиваються у теплих, вологих місцях, добре розповсюджуючись на мертвих тканинах волосся, нігтів і зовнішніх шарів шкіри. До цих інфекційних хвороб відносяться дерматомікоз волосистої частини голови - грибкова інфекція шкіри голови, яка може спричинити випадання волосся; дерматомікоз бороди й вусів - грибкова інфекція бороди й вусів; дерматомікоз гладкої шкіри - грибкова інфекція шкіри, іншої, ніж борода, вуса, пах, руки або ноги; паховий дерматомікоз - грибкова інфекція паху й промежини; епідермофітія стоп (ступень) - грибкова інфекція ніг, відома як стопа атлета; дерматомікоз рук - грибкова інфекція рук, й епідермофітія нігтів - грибкова інфекція нігтів. Зазначені інфекції можуть спричинити ураження, які можуть свербіти. Можуть виникати глибокі запальні вузли. Після лікування можуть залишатися шрами на шкірі, призводячи до гіпер- та (або) гіпопигментації.

Ці інфекційні хвороби є заразними і можуть передаватися через безпосередній контакт або через контакт з оджею, з поверхонь душових і басейнів, і навіть від кімнатних тварин. Розрахунковий ризик заразитися інфекцією дерматофіту протягом життя складає 10-20 відсотків.

Розпізнавання й відповідне лікування цих інфекційних хвороб зменшує як захворюваність, так й дискомфорт і знижує вірогідність передачі. На разі для лікування використовують протигрибкові засоби, такі, як толнафтат, гідрохлорид тербінафіну, гризеофульвін, і імідазоли, такі, як кетоконазол, нітрат міконазола і клотримазол. Гризеофульвін використовують для системної терапії. Для боротьби з запаленням використовують стероїди разом із протигрибковими засобами. Звичайний режим лікування із використанням цих протигрибкових засобів потребує лікування двічі або тричі на день

протягом принаймні 10-14 днів, а для деяких лікарських засобів - до чотирьох тижнів. Можливо, що гідрохлорид тербінафіну у таблетках доведеться приймати протягом тривалого часу, можливо, протягом кількох місяців. Звичайне лікування полягає у нанесенні місцевого протигрибкового засобу протягом двох тижнів після загоєння шкіри, щоб остаточно знищити усі спори грибів, що залишилися. Однак місцеве нанесення не усуває спричинені дерматофітозом запалення й свербіж шкіри. Інфекція часто виникає повторно, і для деяких пацієнтів, наприклад, пацієнтів, хворих на діабет або з циркулярними проблемами, інфекції грибкових хвороб шкіри та їх лікування можуть виявитися вельми серйозними. Нинішня методика лікування є кошовною і має поширені побічні ефекти, такі, як гепатотоксичність, нудота, діарея й імпотенція. Тривале використання і неправильне використання цих лікарських засобів викличе розвинення у мікроорганізмів резистентності до них.

Способи зменшення побічних ефектів лікування включають використання трав'яних композицій. Трави давно відомі й використовуються в усьому світі для лікування багатьох станів, включаючи стани шкіри, і є принаймні деякі свідчення, що трав'яні засоби можуть спричинити менш шкідливі побічні ефекти, ніж відповідні синтетичні лікарські засоби. Але навіть при застосуванні трав'яних засобів при лікуванні медичних станів доводиться наражатися на численні труднощі. Один трав'яний засіб може містити числення активні й іноді конфліктуючі компоненти. Трав'яні засоби, такі, як екстракт чорного горіху, який використовується для лікування стопи атлета, пов'язаних грибкових інфекцій і карцином, а також для зниження артеріального тиску й холестерину, може бути токсичним. Додаткові потенційні труднощі виникають у зв'язку із змінністю концентрації й ефективності активних компонентів від рослини до рослини. У випадку трав'яних композицій ці труднощі значно зростають. Комбінації спричиняють можливість синергічних ефектів між компонентами у різних трав'яних засобах. Хоча це має переваги, можливе й збільшення труднощів, пов'язаних з прогнозуванням й аналізом побічних ефектів.

Отже, важливо з'ясувати ефекти / побічні ефекти екстракту лікарських трав шляхом встановлення присутності й характеристики активної діючої речовини.

За наявною інформацією, багато лікарських трав справляють значні впливи на хвороби шкіри. Трави цієї групи включають, наприклад, *Angelicae pubescentis Radix* для лікування псоріазу. Трави, традиційно відомі або використовувані для лікування стопи атлета, включають, зокрема, чайне дерево, часник, гідрастис і різні частини дерева чорного горіха, яке відоме як токсичне.

Відомо, що й комбінації лікарських трав справляють значні впливи на хвороби шкіри. Наприклад, в одному способі лікування інфекційних грибкових хвороб шкіри трав'яними засобами використовують екстракти з алое деревоподібного, кореню цикорію, котовнику кошачого, звіробою і вітаміни А й Е в основі для крему. Це лікування

рекомендується 3-4 рази на день протягом 2-3 днів після загоснення усіх уражень.

У патенті США №6254897 описується композиція, ефективна проти інфекційних грибкових хвороб шкіри, в якій використовуються натуральні речовини, одержані зі сполучення *Angelicae pubescentis Radix*, *Notopterygium Radix* і *Haliotis diversicolor* Reeve. Недоліками цієї композиції є такі:

а) Вона представляє собою суміш трьох або більше рослинних екстрактів. Отже, ці рослини комусь необхідно збирати або розводити.

б) У традиційній медицині ці рослини не описуються як такі, що мають активність проти інфекційних грибкових хвороб шкіри, отже, можуть знадобитися детальні дослідження, щоб встановити їх безпечність.

в) Патент не містить інформацію про активну діючу речовину, присутню у рослинному екстракті / екстрактах, який „відповідає” за активність проти інфекційних грибкових хвороб шкіри.

г) Патент не містить інформацію про синергічний ефект використовуваних рослинних екстрактів.

Отже, є потреба розробити нову композицію, спроможну здолати вищезазначені проблеми, пов'язані із синтетичними препаратами або екстрактами лікарських трав, використовуваними наразі, для лікування інфекційних грибкових хвороб шкіри.

*Hedychium spicatum* - це рослина, що природно росте у субтропічних регіонах, таких, як Індія і Китай, де вона використовується як традиційний лікарський засіб. Крім того, її вирощують у різних частинах світу заради її духмяного кореневища. Традиційні показання для використання *Hedychium spicatum* включають шлунковий засіб, засіб проти диспепсії, заспокоюючий засіб, гіркий тонізуючий засіб, порушення печінки, засіб, сприяючий росту волосся, антибактеріальний, протигрибковий, протизапальний і протималарійний засіб (патентна публікація США №20020155138). Однією з хімічних складових, присутніх у *Hedychium spicatum*, є етил-р-метоксицинамат, про який повідомляється, що він є протидерматофітним (Lloydia, 39(4), 218-222, (1976)).

Немає, однак, ніякої інформації про будь-яку композицію для лікування дерматофітів, що містить *Hedychium spicatum*. Для того щоб здолати проблеми побічних ефектів нинішньої методики лікування і зменшити вартість лікування, пропонується нова трав'яна композиція, яка має протидерматофітну дію, ефективна проти інфекційних грибкових хвороб шкіри і проти реакцій у вигляді свербіжів і запалення за таких інфекційних станів, в якій використовується екстракт, одержаний з рослини *Hedychium spicatum*, який містить як основну діючу речовину ефективну кількість етил-р-метоксицинамату, факультативно, у сполученні з іншими біологічно активними речовинами, такими, як інші протидерматофіти й інгібітор меланогенезу. Крім того, композиція має природні дезодоруючі властивості.

Відповідно, метою цього винаходу є створення трав'яної композиції для лікування інфекційних грибкових хвороб шкіри, яка містить екстракт

*Hedychium spicatum* й ефективну кількість діючої речовини етил-р-метоксицинамату.

Ще однією метою цього винаходу є створення способів приготування й використання композиції для лікування інфекційних грибкових хвороб шкіри, яка містить безпечну й ефективну кількість *Hedychium spicatum*.

Ще однією метою цього винаходу є доставка унікальної трав'яної композиції з інгібуванням фактору альфа некрозу пухлини (TNF- $\alpha$ ), що зменшить свербіж і запалення шкіри, пов'язані з інфекціями грибкових хвороб шкіри.

Ще однією метою цього винаходу є створення способу використання цих продуктів поодиноко або у сполученні з інгібіторами меланогенезу для боротьби з післяінфекційними шрамами на шкірі.

Ще однією метою цього винаходу є створення композиції для швидкого й ефективного лікування інфекційних грибкових хвороб шкіри.

Інші цілі й подальший обсяг застосовності цього винаходу стануть очевидними з подальшого докладного опису. Втім, слід розуміти, що докладний опис і конкретні приклади, хоча й вказують на варіанти здійснення винаходу, наведені лише для ілюстрації, оскільки фахівцям будуть очевидними різні зміни й модифікації у межах сутності й об'єму винаходу.

Фахівець у даній галузі може, ґрунтуючись на наведеному описі, використовувати цей винахід у найповнішій мірі. Наступні конкретні варіанти здійснення мають тлумачитися лише як ілюстративні без обмеження об'єму цього винаходу.

За відсутності іншого визначення, усі технічні й наукові терміни, що вживаються у цьому описі, мають те саме значення, яке вони зазвичай мають у галузі, до якої цей винахід відноситься.

Термін „місцеве (або топічне) застосування”, що вживається у цьому описі, означає безпосереднє накладання на зовнішню шкіру або розмазування на ній, наприклад, руками або аплікатором, скажімо, салфеткою. Термін „безпечна й ефективна кількість”, що вживається у цьому описі, означає кількість сполуки або композиції (наприклад, екстракту *Hedychium spicatum*), достатню, щоб достовірно викликати позитивну модифікацію у стані, що регулюється або лікується, але достатньо низьку, щоб запобігти серйозним побічним ефектам (при розумному співвідношенні між вигодою і ризиком) в обсязі обґрунтованого медичного судження. Безпечна й ефективна кількість сполуки або композиції буде різною залежно від конкретного стану, що лікуватиметься, віку й фізичного стану кінцевого користувача, важності стану, що лікуватиметься / запобігатиметься, тривалості лікування, характеру супутньої терапії, конкретної використовуваної сполуки або композиції, конкретного використовуваного косметично прийняттого носія і схожих факторів.

За відсутності іншого застереження, усі відсотки відображають масову частку. Термін „екстракт *Hedychium spicatum*”, згадуваний у цьому описі, означає суміш сполук, присутніх у рослині *Hedychium spicatum*. Ці сполуки можна екстрагувати з висушеного кореневища цієї рослини добре відомими способами (наприклад, з використанням

органічних розчинників, наприклад, нижчі спирти, алкілові складні ефіри, алкілові прості ефіри, алкілкетони, хлороформ, нафтовий простий ефір, гексан, та (або) неорганічних розчинників, наприклад, вода). В одному варіанті здійснення екстракт *Hedychium spicatum* містить лише гідрофобні сполуки (наприклад, ізольовані з використанням гідрофобного розчинника, такого, як хлороформ, нафтовий простий ефір, гексан). Однією з вказаних гідрофобних сполук є діюча речовина етил-р-метоксицинамат. Екстракт переважно містить ефективну кількість (4-10%) етил-р-метоксицинамату, яку можна оцінити, користуючись звичайними методами кількісного визначення, наприклад, вискооефективна тонкошарова хроматографія або вискооефективна рідинна хроматографія.

Цей екстракт потім використовують для приготування місцевих препаратів, що містять 0,1-20мас. % екстракту кореневища, переважно, приблизно 2,5-10мас. %, який ретельно вмішують у звичайну основу, про що докладніше йтиметься нижче. Слід зазначити, що для того щоб досягти бажаних результатів, для більшості цільових станів достатнім є екстракт кореневища, що містить 4-10мас. % етил-р-метоксицинамату, переважно, 6-8мас. %.

Місцеві препарати, що використовуються за цим винаходом, включають склади, підходящі для місцевого нанесення на шкіру. Композиції можна готувати у вигляді самих різноманітних видів продукту, включаючи серед інших лосьйони, креми, гелі, олівці, аерозолі, мазі, рідкі очищувальні склади й тверді мила, шампуні, пасти, муси, салфетки, бляшки, пов'язки на рани й лейкопластирні пов'язки, гідрогелі, плівки та косметичні засоби.

При приготування остаточної композиції можна використовувати кілька традиційних інгредієнтів, наприклад, воду; ланолін; вазелін; гліцерин; тригліцериди жирних кислот; поліетиленгліколи; оксиетильовані жирні спирти; складні ефіри, такі, як ізопропілпальмінат; міристан і стеарат; силіконові масла; олеїловий олеат і бутілстеарат; тваринні, рослинні й мінеральні масла; жирні спирти; моностеарат гліцерину й органічні й мінеральні парафіни. Ці інгредієнти зазвичай використовуються у кількості приблизно 10-97мас. % загального складу і можуть бути одно- або багатофазовою системою.

Одним з продуктів, що можна приготувати, є крем. Крем типово містить приблизно 5-50% (наприклад, приблизно 10-20%) зм'якшувача (зм'якшувачів) і приблизно 45-85% (наприклад, приблизно 50-75%) води.

Іншим видом продукту, що можна приготувати, є мазь. Мазь може містити просту основу з тваринних або рослинних масел або напівтвердих вуглеводнів. Крім того, мазі можуть містити абсорбційні основи, які абсорбують воду з утворенням емульсій. Мазь може містити приблизно 2-60% зм'якшувача (зм'якшувачів) плюс приблизно 2-60% загусника (загусників).

Крім того, пропонувані композиції можна готувати у вигляді твердого складу (наприклад, склад у вигляді олівця на основі парафіну або куска ми-

ла). За іншим варіантом здійснення, для одержання синергічного ефекту місцева композиція на додаток до екстракту *Hedychium spicatum* далі містить ще один рослинний екстракт, що проявляє протидерматофітну активність. Рослина може вибиратися з групи рослин, яка складається з *Curcuma zedoaria*, *Caempferia galanga*, *Angelicae pubescentis Radix*, *Notopterygium Radix* і *Haliotis diversicolor* Reeve для екстрагування.

За ще одним варіантом здійснення, для одержання синергічного ефекту місцева композиція на додаток до екстракту *Hedychium spicatum* далі містить ще одну синтетичну сполуку, що проявляє протидерматофітну активність. Синтетичні сполуки можна вибирати з протигрибкових засобів, таких, як гризеофульвін, толнафат і гідрохлорид тербінафіну, і імідазолів, таких, як нітрат міконазола і флорімазол.

За ще одним варіантом здійснення, для одержання синергічного ефекту місцева композиція на додаток до екстракту *Hedychium spicatum* далі містить інші природні інгібітори меланогенезу, які можуть забезпечити бездефектну шкіру після інфекції. Природний інгібітор меланогенезу може вибиратися з лакриці, глабратину, глабрену, арбутину, курку міну, елагової кислоти, екстракту гранату.

Пропоновані композиції підходять для використання при лікуванні як гострих, так і хронічних форм інфекційних грибкових хвороб шкіри, зокрема, інфекційних хвороб, викликаних родами грибів *Trichophyton*, *Microsporum* і *Epidemophyton* у здорових й імунологічно ризикових людей. Пропоновані композиції мають додаткові переваги:

а) протизапальна активність екстракту і діючої речовини етил-р-метоксицинамату, завдяки якій лікуються як запалення, так й свербіж, пов'язані з інфекціями грибкових хвороб шкіри;

б) природна дезодоруюча властивість екстракту, яка зменшить неприємний запах, пов'язаний з певними інфекціями грибкових хвороб шкіри.

#### Приклад 1

Приготування екстракту *Hedychium spicatum*  
Висушене кореневище *Hedychium spicatum* (100г) перетворили на порошок. Перетворений на порошок матеріал піддали екстрагуванню із використанням хлороформу (500мл) шляхом дефлегмації при температурі +60°C протягом 3 годин. Екстракт відфільтрували у вакуумі. Цей процес екстрагування повторили ще двічі. Екстракти поєднали і концентрували для видалення розчинника.

Вихід: 2,5г.

Вміст етил-р-метоксицинамату в екстракті (визначений методом вискооефективної тонкошарової хроматографії): 6,5мас. %.

#### Приклад 2

Виділення етил-р-метоксицинамату

Перетворене на порошок кореневище *Hedychium spicatum* (5кг) піддали екстрагуванню із використанням гексану при перемішуванні при температурі +60°C протягом 1 години. Екстракт відфільтрували у вакуумі. Цей процес екстрагування повторили ще двічі. Об'єднані фільтрати

випарили насухо і одержали сирий екстракт. Вихід: 134г.

Сирий екстракт (100г) очистили колонковою хроматографією (силікагель, нафтовий простий ефір) і одержали етил-р-метоксицинамат. Остаточну очистку здійснили шляхом кристалізації із використанням нафтового простого ефіру.

Вихід: 3,5г; точка плавлення +48-50°C; <sup>1</sup>H ЯМР (ядерний магнітний резонанс) (CDCl<sub>3</sub>, 300МГц): δ 1,33 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4,26 (q, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,28 (s, 1H), 6,33 (s, 1H), 6,88 (t, 3H), 7,46 (d, 1H); MS : t/e (EI) 206 (M<sup>+</sup>).

#### Приклад 3

Проти-TNF-а активність екстракту *Hedychium spicatum* і лідерної молекули.

Кількісне визначення для скринінгу у мононуклеарних (однойдерних) клітинах людської периферійної крові (hPBMCs).

Виробництво TNF-α ліпополісахаридом (ЛПС) у hPBMC вимірили методом, описаним Янські Л. та іншими (Jansky, L. et al) (Physiol. Res. 52, 593-598, (2003)). Кров брали у здорових донорів у пробірці вакуумної тари, покриті етилендіамінтетраацетатом (ЕДТА) калію (Vacutest Plast), і розводили 1:2 фосфатно-буферним розчином (ФБР) Дульбекко (виробник - компанія Sigma Aldrich, м. Сент-Луїс, штат Міссурі). Мононуклеарні клітини периферійної крові зібрали з людської крові й суспендували у середовищі культури RPMI 1640 (виробник - компанія Gibco BRL, м. Паслі, Сполучене Королівство), яке містило 10% фетальної бичачої сироватки (ФБС) (виробник - компанія Нусіопе, штат Юта, США), 100 одиниць/мл пеніциліну (ви-

робник - компанія Sigma Chemical Co., м. Сент-Луїс, штат Міссурі) і 100мкг/мл стрептоміцину (виробник - компанія Sigma Chemical Co., м. Сент-Луїс, штат Міссурі). Концентрацію клітин відкоригували до 1x10<sup>6</sup> клітин/мл. Суспензію клітин (100мкл) додали у лунки 96-лункового культурального планшета. Після посіву клітин до клітин додали 79мкл культурального середовища й 1мкл восьми різних концентрацій дослідницьких зразків (10-100мкг/мл), розчинених у диметилсульфоксиді (ДМСО, виробник - компанія Sigma, штат Міссурі, США). Остаточну концентрацію ДМСО відкоригували до 0,5-1%. Як стандартну сполуку використовували роліпрам (100мкМ). Планшети інкубували протягом 30 хвилин при температурі +37°C в атмосфері 5%-го CO<sub>2</sub>. Насамкінець, додали 20мкл (10мкг/мл) на лунку ЛПС *Escherichia coli* 0127:B8, виробник - компанія Sigma Chemical Co., м. Сент-Луїс, штат Міссурі) для одержання остаточної концентрації 2мкг/мл. Планшети інкубували при температурі +37°C протягом 5 годин в атмосфері 5%-го CO<sub>2</sub>. Надосадкові рідини зібрали й піддали аналізу на відсоткове пригнічення TNF-α шляхом імуносорбентного аналізу із застосуванням фіксованих ферментів відповідно до інструкції виробника (виробник - компанія R&D Systems, штат Міннесота) або біоаналізом на цитотоксичність у кліток L929.

Результати. Пригнічення TNF-α екстрактом *Hedychium spicatum* і лідерною молекулою (етил-р-метоксицинамат) у поліморфних ядерних клітинах людської крові наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

#### Пригнічення TNF-а у поліморфних ядерних клітинах людської крові

Зразок	Концентрація (мкг/мл)	Відсоткове пригнічення TNF-α
Екстракт прикладу 1	10	5
Екстракт прикладу 1	100	96
Етил-р-метоксицинамат	10	0
Етил-р-метоксицинамат	100	80

Висновок. Екстракт *Hedychium spicatum* і лідерною молекулою (етил-р-метоксицинамат) пригнічують активність TNF-альфа.

Результати. Цитотоксичність екстракту *Hedychium spicatum* і лідерної молекули (етил-р-метоксицинамат) у лініях кліток L929 наведена у таблиці 2.

Таблиця 2

#### Цитотоксичність у лініях кліток L929

Зразок	Концентрація (мкг/мл)	3,5год.	24год.
Екстракт прикладу 1	10	00	05
Екстракт прикладу 1	100	03	14
Етил-р-метоксицинамат	10	20	27
Етил-р-метоксицинамат	100	12	02

Висновок. Екстракт *Hedychium spicatum* і лідерної молекули (етил-р-метоксицинамат) проявляють низьку цитотоксичність при вимірюваннях ліній кліток L929.

#### Приклад 4

#### Приготування складу мазі Загальна процедура

Зважують і переносять усі інгредієнти 01-05 (див. таблицю 3) у заданій кількості у підходящу судину. Інгредієнт плавлять, використовуючи во-

дяну баню і добре перемішують. У вищезазначену суміш додають задану кількість екстракту *Hedychium spicatum* прикладу 1 і добре перемішують у гомогенізаторі. Вміст рівномірно охолоджують при перемішуванні до одержання мазі.

Результати. Склади, що містять 2,5, 5 і 10% екстракту *Hedychium spicatum*, наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Склад мазі *Hedychium spicatum*

№	ІНГРЕДІЄНТ	Мазь I, мас. %	Мазь II, мас. %	Мазь III, мас. %
01	Білий бджолиний віск	5,00	5,00	4,50
02	Твердий парафін	13,50	9,50	9,50
03	Мікрокристалічний віск	9,00	9,50	9,50
04	Білий м'який парафін	50,00	52,00	55,00
05	Світлий рідкий вазелін	12,50	19,00	19,00
06	Екстракт прикладу 1	10,00	5,00	2,50
	Разом	100,00	100,00	100,00

Приклад 5  
Приготування складу крему  
Загальна процедура  
Зважують і переносять інгредієнти 01, 02, 03 й 05 (див. таблицю 4) у заданій кількості відповідно до розміру партії у підходящу судину. Інгредієнт плавлять, використовуючи водяну баню і добре перемішують. У вищезазначену суміш додають

задану кількість інгредієнту 07 (екстракту *Hedychium spicatum* прикладу

1) і добре перемішують. Зважують і розчинюють інгредієнт 04 в інгредієнті 06 і додають у вищезазначену суміш і добре перемішують до одержання крему.

Результати. Склади, що містять 2,5, 5 і 10% екстракту *Hedychium spicatum*, наведені у таблиці 4.

Таблиця 4

Склад крему *Hedychium spicatum*

№	ІНГРЕДІЄНТ	Мазь I, мас. %	Мазь II, мас. %	Мазь III, мас. %
01	Білий бджолиний віск	18,00	17,27	17,73
02	Світлий рідкий вазелін	7,20	6,91	7,09
03	Цетостеариловий спирт	9,72	9,33	9,57
04	Лаурилсульфат натрію	1,08	1,04	1,06
05	Феноксietанол	0,90	0,86	0,89
06	Вода	53,10	59,59	61,16
07	Екстракт прикладу 1	10,00	5,00	2,50
	Разом	100,00	100,00	100,00

Приклад 6  
Протидерматофітна активність складів  
Процедура аналізу *in vitro*  
Організми: *Trichophyton mentagrophytes* та *Microsporum gypseum*.

Приготування інокуляту (посівного матеріалу)  
Культури вирощували на скошеному агарі-агарі PDA при температурі +28°C протягом 7 днів. Ріст покрили стерильним соляним розчином з зіскребли, щоб отримати суспензію росту. Результуючу суміш конідій або спорангіоспор і тіпальних фрагментів перенесли у стерильну пробірку. Важким часткам дали осісти, а верхню однорідну суспензію перенесли в іншу пробірку. Ці суспензії відкоригували до оптичної щільності у межах 0,00-0,11 (коефіцієнт пропускання 80-82%), використовуючи спектрофотометр. Ці маточні суспензії далі розвели 1:10 соляним розчином для одержання дослідного інокуляту 1x10<sup>3</sup> - 1x10<sup>5</sup> к/о/мл).

Приготування зразків

Мазь і крем. У демінералізованій воді +0,01 Tween 20 приготували маточний розчин 100 мг/мл мазі й крему із зразків 4 і 5. Розрахункову кількість маточного розчину додали у 20 мл середовища плавненого агару Сабуро й розлили по чашкам Петрі, щоб одержати кілька послідовних двократних розведень екстракту у цьому середовищі. Під час первісного дослідження для обох складів використовували п'ять концентрацій 100, 50, 25, 10 і 5% мг/мл. Повторні дослідження проводили із використанням нижчих концентрацій обох складів: 5, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 і 0,1.

Екстракт прикладу 1 і етил-р-метоксицинамат  
Вищеописаним способом приготували розведення екстракту з концентрацією 0,01-0,10 мг/мл.

До досліджень включили контрольний планшет росту без будь-якого екстракту або складу.

Як стандарти для порівняння використовували зразки, що є у продажу, кетоконазолу (2%) концен-

трацією 0,5мг/мл і толнафтату. (1%) концентрацією 0,05мг/мл.

Кількісне визначення

Суспензії культур, приготовлені вищеописаним способом, нанесли мазками у кількості 10мкл на отверділі планшети. Мазки висушили при кімнатній температурі, після чого планшети інкубували при температурі +28°C протягом 48 годин.

Критерії кінцевої точки

МПК (мінімальну пригнічуючу концентрацію) визначали як найнижчу концентрацію екстракту або складу, при якій не спостерігається видимий ріст або яка спричиняє майже повне пригнічення росту на планшетах. Результати наведені у таблиці 5.

Таблиця 5

Протидерматофітна активність складів аналізу in vitro

№	Зразок	МПК (мг/мл)	
		T. mentagrophytes	M. gypseum
1	Мазь I*	1	1
2	Мазь II*	5	5
3	Мазь III*	5	5
4	Крем I**	0,5	0,5
5	Крем II**	1	1
6	Крем III**	5	5
7	Екстракт прикладу 1	0,04	0,04
8	Етил-р-метоксицинамат	0,03	0,03
9	Кетоконазол (2%)* **	0,3	0,3
10	Толнафат (1%)* **	0,05	0,05

\* прикладу 4

\*\* прикладу 5

\*\*\* Місцевий протидерматофітний препарат

Висновки:

1. Склади крему й мазі, що містять екстракт *Hedychium spicatum*, проявляють протидерматофітну активність.

2. Крем проявляє кращу протидерматофітну активність у порівнянні до мазі.

3. Крем, що містить 10% екстракту *Hedychium spicatum*, проявляє протидерматофітну активність, порівняну зі зразком, що є у продажу, місцевого

протидерматофітного препарату, що містить кетоконазол (2%).

Основні переваги цього винаходу:

1. Склад буде ефективним для зменшення свербіжів і запалення, пов'язаних з інфекцією грибкових хвороб шкіри.

2. Склад матиме природну дезодоруючу властивість, що є переважним при лікуванні інфекційної грибкової хвороби шкіри з неприємним запахом.