



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92308** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
A61K 36/61 (2006.01)
A61P 31/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 02601	(72) Винахідник(и): Авідзба Юлія Наліковна (UA), Кошовий Олег Миколайович (UA), Кухтенко Олександр Сергійович (UA), Рибак Вікторія Анатоліївна (UA), Комісаренко Андрій Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 14.03.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.08.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.08.2014, Бюл.№ 15	(73) Власник(и): Кошовий Олег Миколайович, вул. Корчагінців, 52, кв. 34, м. Харків, 61176 (UA)

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ЛИСТЯ ЕВКАЛІПТУ З АНТИМІКРОБНОЮ, ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ТА АНАБОЛІЗУЮЧОЮ АКТИВНІСТЮ

(57) Реферат:

Спосіб одержання засобу з антимікробною, протизапальною та анаболізуючою активністю включає екстракцію рослинної сировини гарячою водою, фільтрацію, упарювання, очищення та сушіння. Як рослинну сировину використовують листя евкаліпту після виділення ефірної олії, екстракцію проводять послідовно і 50 % розчином етанолу при співвідношенні сировини до екстрагенту як 1:3-1:9, упарюванням одержаного рідкого екстракту до 1/20 - 1/22 попереднього об'єму, очищенням шляхом відстоювання та відокремлення надосадової рідини, яку піддають стерилізації.

UA 92308 U

Корисна модель належить до хіміко-фармацевтичної галузі, зокрема до одержання біологічно активних засобів рослинного походження з антимікробною, протизапальною та анаболізуючою активністю з листя евкаліпту після одержання ефірної олії.

Відомий спосіб одержання засобу з анаболізуючою активністю [1], прийнятий як найближчий аналог. Зазначений спосіб полягає у екстракції суцвіть деревію дистильованою водою у співвідношенні 1:10 послідовно 4 рази при 80 °С, кожен раз протягом 35 хвилин. Одержані екстракти об'єднують, концентрують до половини об'єму, проводять очищення на сорбенті з суміші поліаміду і активованого вугілля у співвідношенні 1:0,2 та піддають ліофілізованому сушінню протягом 20-26 годин у сублімаційному апараті зі зниженням тиску від атмосферного до $5 \cdot 10^{-1}$ - $5 \cdot 10^{-2}$ мм рт. ст. і відповідно зниженням температури від -35 до -50 °С через 1-1,5 години. Через 16 годин після початку сушіння температуру поступово підвищують до +40 °С.

Недоліками найближчого аналогу можна вважати необхідність виготовлення спеціально призначеного для нього нестандартного сорбенту, а також використання ліофілізованого сушіння при значній зміні тиску та перепаді температур у 95 °С. При цьому одержаний продукт характеризується односпрямованістю фармакологічної дії.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення способу одержання засобу рослинного походження з антимікробною, протизапальною та анаболізуючою активністю, який передбачає послідовну екстракцію листя евкаліпту водою та 50 % розчином етанолу після промислового одержання ефірної олії евкаліпту, при цьому готовий продукт має розширений спектр фармакологічної дії, а використання заявленого способу для комплексної переробки сировини забезпечить безвідходний процес одержання ефірної олії і додатково нового засобу з антимікробною, протизапальною та анаболізуючою активністю, що позитивно вплине на собівартість одержання обох засобів і дозволить вичерпно використати імпортну сировину.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі одержання засобу з антимікробною, протизапальною та анаболізуючою активністю, що включає послідовну екстракцію рослинної сировини гарячою водою та 50 % розчином етанолу, фільтрацію, упарювання, очищення, стерилізацію та сушіння. Корисною моделлю передбачено, що як рослинну сировину використовують лист евкаліпту, з якого у стандартних промислових умовах методом гідродистилляції при температурі 100 °С протягом 2 годин одержують ефірну олію при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:30, при цьому паралельно водою очищеною екстрагують біологічно активні речовини (БАР) та проводять подальше настоювання протягом 12 годин. Водний витяг відділяють, фільтрують та шрот після виділення ефірної олії екстрагують 50 % розчином етанолу у співвідношенні 1:3 тричі. Водний та спиртові витяги об'єднують, фільтрують та упарюють до 1/20-1/22 попереднього об'єму, очищення проводять шляхом відстоювання у холодильнику та відокремлення надосадової рідини, яку піддають стерилізації та сушать до сухого екстракту у вакуум-розпилювальній сушарці.

Листя евкаліпту є лікарською рослинною сировиною з багатим вмістом біологічно активних речовин, яку традиційно використовують при одержанні ефірної олії, настоянки та хлорофіліпту. Шрот, який залишається після виділення гідрофобних речовин, ще містить водорозчинний комплекс БАР. Авторами встановлено, що переробка шроту у відповідності з заявленим способом, дозволяє одержати засіб з антимікробною, протизапальною та анаболізуючою активністю.

Експериментальним шляхом встановлено, що ефективним при здійсненні заявленого способу є використання співвідношення сировини до екстрагенту як 1:3-1:9. При цьому, якщо співвідношення менше 1:3, не забезпечується достатня екстракція БАР, що приводить до зниження фармакологічної активності та виходу цільового продукту. Навпаки, якщо співвідношення більше 1:9, це веде до ускладнення та подовження технологічного процесу, час упарювання та енерговитрати значно зростають. Оптимальне співвідношення 1:3-1:4 тричі тому, що забезпечується достатня екстракція БАР, час упарювання мінімальний та дозволяє отримувати екстракт на стандартному обладнанні без додаткового перезавантаження первинної сировини.

Очистку екстракту в процесі здійснення заявленого способу проводять шляхом відстоювання в холодильнику, що забезпечує осадження механічних включень та гідрофобних речовин. Відстоювання в холодильнику також запобігає прокисанню водного екстракту.

Згідно з заявленим способом упарювання проводять до 1/20-1/22 первинного об'єму. При більшому упарюванні залишок має більшу в'язкість та зменшується його текучість, що ускладнює роботу з екстрактом та збільшує його втрати в процесі виробництва. При меншому упарюванні значно подовжується процес сушіння, наприклад в вакуум-розпилювальному апараті, та збільшуються енерговитрати.

Одержаний після упарювання екстракт стерилізують будь-яким зручним у промислових умовах способом, наприклад в автоклаві при 120 °С протягом 3-4 годин. Стерилізація забезпечує усунення мікробної контамінації та спор мікроорганізмів, що підвищує якість продукту, безпечність при його застосуванні та збільшує строк збереження.

5 Стерилізований екстракт сушать, наприклад, в вакуум-розпилювальному апараті при температурі на вході 160 °С та на виході 80-90 °С, до сухого екстракту.

Заявлений спосіб забезпечує одержання екстракту листя евкаліпту у вигляді мілкового порошку, зручного для подальшого використання в виробництві та збереження.

10 Заявлений спосіб здійснюють шляхом одержання з листя евкаліпту методом гідродистиляції при температурі 100 °С протягом 2 годин ефірної олії за стандартних умов при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:30 [2], при цьому паралельно водою очищеною здійснюється екстракція гідрофільного комплексу БАР, після зі шроту 50 % розчином етанолу екстрагують витяг, який об'єднують з водним, фільтрують, упарюють до 1/20-1/22 попереднього об'єму з подальшим відстоюванням у холодильнику. Надосадову рідину зливають та стерилізують.

15 Екстракт являє собою прозору рідину темно-коричневого кольору, зі специфічним запахом. Далі водний розчин упарюють до одержання сухого екстракту. Вихід готового продукту 15-25 %.

Одержаний сухий екстракт - гігроскопічний порошок від світло-коричневого до коричневого кольору, зі специфічним запахом. Колір залежить від якості сировини та умов сушіння. Отриманий готовий екстракт містить не менше ніж: 20 % поліфенольних сполук в перерахунку

20 на галову кислоту; 2 % гідроксикоричних кислот в перерахунку на хлорогенову кислоту; 4 % флавоноїдних сполук в перерахунку на рутин.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1. 1 кг подрібненого шляхом вальцювання до розмірів часток 2,5-3,0 мм сухого листя евкаліпту заливали 30 л води очищеної та методом гідродистиляції протягом 2 годин при

25 100 °С виділяли ефірну олію. Сировину залишали для настоювання протягом 12 годин. Одержали 27,5 л водного витягу. До шроту, який залишився, додавали 3,0 л 50 % розчину етанолу та настоювали при кімнатній температурі протягом доби, екстракцію повторювали тричі з новою порцією екстрагенту. Одержані спиртові (8,65 л) та водний витяги (27,50 л) об'єднували, упарювали при температурі 85 °С під вакуумом у вакуум-циркуляційному апараті при

30 розрідженні 690 мм рт.ст. до об'єму водного залишку 2 л. Кубовий залишок являв собою густу прозору темно-коричневу рідину, яку залишали для відстоювання на 2 доби в холодильнику. Відокремлену надосадову рідину стерилізували та сушили у розпилювальній сушарці з температурою теплоносія на вході 160 °С і на виході - 85 °С до сухого екстракту листя евкаліпта. Вихід готового продукту - 22 %.

35 Приклад 2. Вивчення антибактеріальної активності екстракту проводили методом послідовних розведень у рідкому живильному середовищі в Інституті мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова в лабораторії біохімії мікроорганізмів та живильних середовищ під керівництвом канд. біол. н. Осолодченко Т.П. [3, 4, 5]. Відповідно до рекомендацій ВООЗ для

40 оцінки активності препаратів використовували референс-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 6538 ATCC, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* NCTC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* 9027 ATCC, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* 885/653 ATCC. Використовували поживний бульйон для культивування мікроорганізмів, виробництва НПО "Живильні середовища" МООЗ Російської федерації з додаванням глюкози (3 мл на 100 мл бульйону). Екстракт з листя евкаліпту виявляє

45 антибактеріальну дію по відношенню до різних таксономічних груп мікроорганізмів (табл. 1).

Таблиця 1

Дослідження антибактеріальної активності екстракту з листя евкаліпту методом серійних розведень в рідкому живильному середовищі

Мікроорганізми	МГК екстракту евкаліпту, млг/мл
<i>S. aureus</i> 25923 ATCC	30-35
<i>S. aureus</i> 6538 ATCC	30-40
<i>E. coli</i> 25922 ATCC	35-45
<i>P. vulgaris</i> 4636 NCTC	45-50
<i>P. aeruginosa</i> 27853 ATCC	50-55
<i>P. aeruginosa</i> 9027 ATCC	50-60
<i>B. subtilis</i> 6633 ATCC	25-35
<i>C. albicans</i> 885/653 ATCC	45-65

Приклад 3. Протизапальну активність сухого екстракту з листя евкаліпту, одержаного за заявленим способом, вивчали у дослідях на білих мишах масою 18-23 г на моделі формалінового набряку. Препаратом порівняння вибрали вольтарен. Дослідні тварини поділили на три групи: контрольна, група, яку лікували новим екстрактом евкаліпту та лікована препаратом порівняння. Ступінь протизапальної активності нового засобу оцінювали за антиексудативним ефектом.

Для відтворення гострого асептичного ексудативного запалення використовували як флоген 2 % розчин формаліну, який вводили субплантарно в кількості 0,05 мл через 1 годину після перорального введення досліджуваного екстракту евкаліпту, препарату порівняння вольтарену і у контрольній групі - води. Активність досліджуваних засобів вивчали за їх здатністю зменшувати розвиток набряку в порівнянні з контролем.

Отримані на моделі формалінового набряку у мишей результати свідчать про виражену протизапальну активність сухого екстракту з листя евкаліпту, отриманого шляхом комплексної переробки. Максимальний антиексудативний ефект екстракту 64,54 % спостерігався у дозі 20 мг/кг.

Приклад 4. Співробітниками ДП ДНЦЛЗ за нашою участю в лабораторії загальної фармакології під керівництвом к.м.н. Чайки Л.О. проведені дослідження по виявленню та вивченню анаболізуючої активності сухого екстракту з листя евкаліпту. Дослідження проводились в порівнянні з відомим нестероїдним анаболізуючим препаратом калію оротатом ("Борщаговський ХФЗ", сер. 1411, придатний до XI.2012 г.) [4, 5, 6].

Як показники анаболізуючої дії вибрали вміст ДНК та загального білка, котрі визначали в тканинах м'язів [3, 7, 8].

Дослідження проводили на 23 нелінійних щурах-самцях. Препарати вводили внутрішлунково кожен день протягом 10 діб: екстракт евкаліпту - в дозах 200 та 600 мг/кг (по насипній масі), що відповідає 2 % та 6 % від вищої разової дози екстракту; калію оротат - в дозі 200 мг/кг (по калію оротату). Контрольній групі тварин вводили воду очищену в еквівалентному об'ємі.

Через 24 години після останнього введення дослідних препаратів щурів декапітували, вилучили печінку та м'яз задньої сторони стегна. М'яз заморожували і зберігали в рідкому азоті. Для проведення дослідів тканини подрібнювали: печінку пропускали через прес, м'яз розтирали в фарфоровій ступці в рідкому азоті.

В подрібнених тканинах визначали вміст ДНК за методом Трудолюбової М.Г. [7] та загального білка за методом Miller G.I. [8].

Десятиденне внутрішлункове введення крисам екстракту з листя евкаліпту в дозі 200 мг/кг викликає помітну тенденцію до підвищення вмісту ДНК в м'язі на 18 %. Вміст білка при цій дозі екстракту не змінюється (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив 10-ти денного внутрішлункового введення екстракту з листя евкаліпту на вміст загального білка та ДНК в м'язах щурів

Препарат	Доза мг/кг	N	ДНК		Загальний білок	
			мкг/г тканини	приріст відносно контролю, %	мкг/г тканини	приріст відносно контролю, %
Контроль	-	7	445±50,1	-	121±5,13	-
Екстракт евкаліпту	200	5	526±62,3	+18	124±3,88	+1
	600	5	623±51,2	+40	143±3,51	+18
Калію оротат	200	5	521±45,5	+ 17	131±1,85	+8

При введенні екстракту в дозі 600 мг/кг зареєстровано значне достовірне підвищення рівня ДНК в м'язі на 40 % при достовірному зростанні вмісту загального білка на 18 %.

Калію оротат в дозі 200 мг/кг на вміст ДНК та загального білка в м'язі щурів спричиняє ефект, порівняний для дози екстракту 200 мг/кг.

При визначенні вмісту ДНК та загального білка в печінці щурів, які отримували екстракт в зазначених дозах, не виявлено будь-яких змін в їх рівні. Тобто, десятиденне внутрішлункове введення екстракту в дозах 200 та 600 мг/кг спричиняє дозозалежну анаболізуючу активність на м'яз щурів, підвищуючи вміст ДНК та загального білка.

Приклад 5. Нешкідливість сухого екстракту евкаліпту, одержаного за заявленим способом, оцінювали за рівнем гострої токсичності після однократного внутрішлункового введення в дозах

5 і 10 г/кг здоровим білим нелінійним мишам. Спостереження за тваринами проводили протягом 14 діб. Як препарат порівняння використовували відомий нестероїдний анаболізуючий засіб Калію оротат [6].

Встановлено, що введення екстракту евкаліпту в максимальних дозах (10 г/кг) не викликає клінічно обумовлених симптомів інтоксикації й не приводить до летальних випадків, тоді як Калію оротат у максимальній дозі (6,67 г/кг) викликає 16,7 %-у смертність. Таким чином, екстракт евкаліпту характеризується високим рівнем нешкідливості й по класифікації токсичності належить до V класу токсичності - практично нетоксичним лікарським речовинам [5].

Таким чином заявлено новий спосіб одержання засобу з антимікробною, протизапальною та анаболізуючою активністю, який відзначається рядом переваг:

1) простота виконання та можливість здійснення на стандартному обладнанні в промислових умовах України;

2) використання як екстрагенту води та 50 % розчину етанолу, тобто спосіб доступний, екологічно безпечний, дешевий, такий що не вимагає роботи з отруйними, вогнебезпечними й шкідливими для здоров'я людини реактивами;

3) використання в якості сировини як листя евкаліпту після виробництва ефірної олії евкаліпту, що дозволяє комплексно переробляти дану рослинну сировину, більш раціонально використати природні ресурси, підвищити рентабельність виробництва та зменшити його негативний вплив на навколишнє середовище;

4) наявність вираженої антимікробної, протизапальної та анаболізуючої активності екстракту евкаліпту, одержаного за заявленим способом;

5) перспективність використання одержаного екстракту як лікарської субстанції для одержання різних лікарських форм;

6) нетоксичність екстракту, одержаного за заявленим способом, дозволяє використовувати його довгостроково при лікуванні за рекомендацією лікаря;

7) тривалий термін зберігання засобу, одержаного заявленим способом.

Джерела інформації:

1. Пат. № 2026076 РФ МКИ⁶ А61К35/78. Способ получения средства, обладающего анаболической активностью / А.В.Мазулин, Н.А.Калюшина, В.И.Мозуль, Г.Н.Липкан. - № 4914474/14; Заявл. 25.02.91; Опубл. 10.01.95, Бюл. № 1.

2. Державна Фармакопея України / ДП "Науково-експертний фармакопейний центр". - 1-е вид. - Доповнення 2. - Харків: ДП "Науково-експертний фармакопейний центр", 2008. - 620 с.

3. A new herbal remedy with anabolic activity on the basis of hydrophilic compounds of Eucalyptus leaves / Oleg M. Koshoviy, Victoria S. Kyslichenko, Victoria V. Velma, Andrej M. Komisarenko // Herba Polonica. - 2008. - Vol. 55. - № 1. - P. 72-77.

4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод, рекомендації. / За ред. чл.-кор. АМН України О.В.Стефанова. - К.: Здоров'я, 2001. - С 292-306.

5. Експериментальне вивчення токсичної дії потенціальних лікарських засобів. Методичні рекомендації / Коваленко В.М., Стефанов О.В., Максимов Ю.М., Трахтенберг І.М. // В сб.: Доклінічні дослідження лікарських засобів. Ред. О.В. Стефанов. - К.: МОЗ України, Державний фармакологічний центр, 2001. - С. 74-97.

6. Компендиум. Лекарственные препараты 2011 г. / Под ред. проф. В.Н.Коваленко и проф. А.П.Викторова. - К.: Морион, 2011. - 2911 с.

7. Трудолюбова М.Г. Количественное определение РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных // Современные методы биохимии. Ред. В.Н.Орехович. - М.: Медицина, 1977. - С. 113-116.

8. Miller G.I. Protein determination for large number of sample // Anal. Chem. - 1959. - Vol. 31, № 5. - P. 964-966.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання засобу з антимікробною, протизапальною та анаболізуючою активністю, що включає екстракцію рослинної сировини гарячою водою, фільтрацію, упарювання, очищення та сушіння, який **відрізняється** тим, що як рослинну сировину використовують листя евкаліпту після виділення ефірної олії, екстракцію проводять послідовно і 50 % розчином етанолу при співвідношенні сировини до екстрагенту як 1:3-1:9, упарюванням одержаного рідкого екстракту до 1/20-1/22 попереднього об'єму, очищенням шляхом відстоювання та відокремлення надосадової рідини, яку піддають стерилізації.

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601