

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и касается способа получения лекарственных средств растительного происхождения.

Известен противовоспалительный препарат калефлон и способ его получения из цветков ноготков лекарственных, который включает следующие стадии: экстракцию органическим растворителем, очистку от сопутствующих веществ путем смены растворителей, отгонку растворителей, сушку, измельчение, таблетирование. Конечный продукт представляет собой сухой фитоэкстракт от светло-коричневого до коричневого цвета, со слабым, специфическим запахом, практически не растворимый в воде и спирте.

Признаками аналога, совпадающими с признаками заявляемого изобретения, являются:

- противовоспалительное действие;
- растительное сырье;
- экстракция;
- сушка;
- измельчение.

Однако, действие указанного препарата монофункционально, при его получении используются токсические вещества, что не исключает присутствия их следов в препарате.

Известен также препарат растительного происхождения ротокан, обладающий противовоспалительной активностью, и способ его получения из цветков ромашки аптечной, цветков календулы лекарственной и травы тысячелистника в соотношении 2:1:1 (МКИ: А61К 35/78. А. с. № 1670850. Способ получения препарата ротокан, обладающего противовоспалительным действием /Рыбалко К.С., Соколов С.Я., Коновалова О.А. и др. Заявка № 4759110/14 от 06.10.89). Сырье тщательно перемешивают, загружают в батарею из 6 перколяторов и заливают шестикратным количеством 40%-ного спирта, оставляют на 24 ч, после чего медленно спускают первое извлечение, вытесняя его порцией 40%-ного спирта, и оставляют на 24 часа для получения 2 извлечения. В перколятор 2 загружают 100 г смеси сырья, заливают первым извлечением из перколятора 1 и оставляют на 24 ч. По такой же схеме загружают остальные перколяторы. Сырье экстрагируется 6 раз, экстракт выдерживают 5 дней в холодильнике для осаждения балластных веществ, после чего фильтруют. Выход конечного продукта не превышает 6% от массы исходного сырья.

Признаками прототипа, совпадающими с существенными признаками заявляемого изобретения, являются:

- противовоспалительное действие;
- растительное сырье;
- экстракция;
- фильтрация;
- промежуточная дозированная расфасовка.

Однако недостатками этого способа являются: несовершенство получаемой лекарственной формы, приготавливаемой из растений непосредственно под заказ, ограниченный спектр действия, получение ротокана многоступенчато, требует использования огнеопасных токсических растворителей, препарат неоднократно подвергают воздействию высоких температур, кроме того, процесс длителен, ресурсо- и энергоемок и не обеспечивает достаточно высокого выхода конечного продукта.

В основу изобретения поставлена задача создания способа получения вещества с противовоспалительной, антимикробной, седативной и антиоксидантной активностью путем водной экстракции из растительного сырья с целью исключения в конечном продукте следов токсических растворителей и обеспечения выхода конечного продукта не ниже 20% от массы исходного сырья.

Поставленная задача решается тем, что в способе получения из растительного сырья вещества, обладающего противовоспалительной активностью, включающем экстракцию, фильтрацию и промежуточную дозированную расфасовку, согласно изобретению шрот эфиромасличного производства соцветий лаванды настоящей - *Lavandula vera* L., сем. *Lamiaceae* - экстрагируют в горячей воде (температура 80-100°C) при соотношении сырье-экстрагент 1:10 в течение не менее 3-х часов при одновременном измельчении сырья в среде экстрагента до размера 2-5 мм, экстракт фильтруют, жидкую фракцию дозированно разливают во флаконы объемом 10 мл с высотой столба жидкости 5,0±0,5 см и подвергают лиофилизации (сублимации) в интервале температур от -25°C до +45°C при давлении 1 атм. Целевой продукт представляет собой мультidisперсный порошок со степенью измельчения 5-50 мк, желто-коричневого цвета с характерным запахом лаванды.

Исходным сырьем служит вторичный продукт получения эфирного масла лаванды методом гидро-дистилляции. Стандарт на исходное сырье: ОСТ 10-40-87 Госагропром СССР.

Причинно-следственная связь между перечисленными существенными признаками и заявленным техническим результатом поясняется следующим.

Влияние соотношения сырье-экстрагент на выход целевого продукта представлено в табл. 1.

Влияние температуры и времени экстракции на выход целевого продукта представлено в табл.2.

Таблица 1

Влияние соотношения сырье-экстрагент на выход целевого продукта из шрота лаванды настоящей

Экстрагент, вес.ч.	Сырье, вес. ч.	Выход, %
5	1	10.3

10	1	21.0
12	1	21.0
15	1	21.0

Таблица 2

Влияние температуры и времени экстракции на выход целевого продукта из шрота лаванды настоящей

Температура, °С	Время, ч	Выход, %
70	2	18.3
80	2	18.9
90	2	19.4
100	2	19.9
70	3	20.0
80	3	21.0
90	3	21.0
100	3	21.0
100	4	21.0

Вещество по заявляемому способу - сублимат водного извлечения из шрота лаванды настоящей является однокомпонентным и довольно сложным по химическому составу. Идентификация проводилась методом хроматографического анализа и качественными реакциями, определившими в составе заявляемого вещества: флавоноиды, дубильные вещества, тритерпеноиды (олеановая и урсоловая кислоты), фенолокислоты, полисахариды. В результате определен аминокислотный и элементный состав фракций лаванды настоящей.

Для выбора оптимального варианта препарата проводилась избирательная экстракция нативного растения и промышленного шрота водой и 40% этанолом, в результате чего были получены 3 препарата:

- 1) сублимат водного извлечения из нативного растения лаванды настоящей;
- 2) сублимат водного извлечения из шрота лаванды настоящей (вещество по заявляемому способу);
- 3) сублимат 40% этанольного извлечения из шрота лаванды настоящей.

В результате физико-химических и биологических испытаний было установлено, что вещество по заявляемому способу при прочих равных условиях обеспечивает экологически чистую технологию производства и низкую себестоимость целевого продукта.

Аминокислотный и элементный состав фракций лаванды настоящей представлен в табл. 3,4.

Таблица 3

Свободные аминокислоты в исследуемых образцах лаванды настоящей

Состав аминокислотной фракции	Лаванда настоящая, сублимат, промиле		
	вещество по заявляемому	водное извлечение из нативного	40% этанольное извлечение из шрота

	способу	растения	
1. Аспаргиновая к-та	22.70	12.74	12.80
2. Треонин	15.90	49.42	6.42
3. Серин	-	-	11.70
4. Глютаминовая к-та	5.48	73.80	-
5. Пролий	45.03	-	-
6. Глицин	7.22	19.95	6.17
7. Аланин	-	-	0.68
8. Валин	8.88	9.04	1.76
9. Метионин	1.43	1.45	3.74
10. Изолейцин	1.19	0.57	0.28
11. Лейцин	1.04	1.03	1.11
12. Тирозин	7.22	35.20	0.97
13. Фенилаланин	20.16	40.50	6.70
14. Гистидин	3.96	5.51	2.94
15. Лизин	22.50	30.52	17.00
16. Аргинин	4.53	9.34	0.54

Изучение биологической активности проводилось с использованием общепринятых информативных тестов.

Обозначения, использованные в таблицах:

п - количество опытов;

М - среднее значение;

m - ошибка среднего значения;

P - достоверность отличия.

Таблица 4

Элементный состав фракций лаванды настоящей

Элемент	Массэлементное содержание, промиле		
	вещество по заявляемому способу	водное извлечение из нативного растения	40% этанольное извлечение из шрота
Mg	7.013	4.204	2.943
Al	0.591	0.645	0.000

Si	0.210	1.175	0.261
----	-------	-------	-------

Продолжение табл. 4

Элемент	Массэлементное содержание, промиле		
	вещество по заявляемому способу	водное извлечение из нативного растения	40% этанольное извлечение из шрота
P	4.650	4.852	4.089
S	4.624	4.504	5.911
Cl	6.428	8.634	5.722
K	67.018	58.764	46.460
Ca	9.476	16.501	34.615
Fe	0.000	0.726	0.000

Противовоспалительную активность предлагаемого средства оценивали на моделях формалинового и каррагенинового воспаления у белых мышей обоего пола массой 16-18 г в дозе 100 мг/кг в сравнении с широко применяемыми в медицине антифлогистиками - амидопирином, ортофеном (вольтареном), преднизолоном и препаратом-прототипом калефлоном. Исследуемые препараты лаванды растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривенно за 1 час до введения формалина или каррагенина. Прирост объема воспаленной стопы оценивали онкометрически до и через 4 часа после введения агента. О противовоспалительном действии судили по приросту объема стопы в процентах от исходного и торможению развития отека по сравнению с контролем. Контролем служило введение физиологического раствора. Результаты приведены в табл. 5.

Таблица 5

Противовоспалительная активность сублимата из шрота лаванды настоящей (n=6)

Препарат	Доза, мг/кг	Увеличение объема воспаленной стопы в % к интактной при введении					
		формалина		P	каррагенина		P
		M	m		M	m	
Вещество по заявляемому способу	100	30.3	2.2	< 0.005	46.1	2.3	<0.05
Калефлон	100	27.4	1.5	< 0.005	39.1	2.2	<0.05
Физиологический раствор	-	65.0	2.6	-	78.7	2.8	-

По данным табл. 5 противовоспалительная активность вещества по заявляемому способу не уступает активности препарата-прототипа.

Антимикробную активность исследовали методом серийных разведений препаратов лаванды настоящей в диапазоне концентраций от 62 до 200 мкг/мл и посевом на плотной питательной среде (агаре). Контролем служили аналогичные питательные среды, не содержащие и содержащие растворитель (0.9% раствор натрия хлорида), но не влияющие на жизнедеятельность тест-культур. Концентрацию культур определяли по оптическому стандарту мутности N 10, разведение производили стерильным 0.9% раствором натрия хлорида до 10 мкг/мл. Бактериальной петлей наносили испытуемые культуры на поверхность питательного агара, гомогенизированного с сублиматами лаванды настоящей. На одной чашке производили

радиально посев 10-12 культур, инкубировали при температуре 37°C в течение 18-20 ч. Учет результатов вели при наличии роста культуры в контрольной чашке, а минимальную ингибирующую концентрацию сублимата определяли по последней чашке Петри, где отмечалась полная задержка роста тест-культуры. Антимикробную активность исследовали на 45 штаммах представителей кокковой, кишечной, спорообразующей микрофлоры и некоторых грибов. Спектр антимикробной активности приведен в табл. 6.

Сравнительные данные антимикробной активности вещества по заявляемому способу и препарата калеплон приведены в табл. 7.

Седативную активность определяли методом изучения влияния на двигательнo-оборонительные рефлексy у крыс.

Изучение влияния предлагаемого вещества на динамику укрепления двигательнo-оборонительного рефлекса проводилось на 15 нелинейных белых крысах массой 260-300 г.

Эксперимент проводили в стандартной челночной камере фирмы Ugo Basile. Каждая программа включала по 20 реализаций злектроболевого раздражения, силой по 25 вольт по относительной шкале потенциометра. Челночная камера, снабженная световым и звуковым сигналами, помещалась в темную изолированную комнату.

Таблица 6

Спектр антимикробной активности экстрактов лаванды настоящей (n=5)

№	Тест-культуры	Антибактериальная активность, мкг/мл		
		вещество по заявляемому способу	сублимат водного извлечения из нативного сырья лаванды	сублимат 40% этанольного извлечения из шрота лаванды
1.	St. aureus 209 P	1000	1000	2000
2.	St. aureus Macarov	400	500	2000
3.	St. aureus Lossmanov	500	500	2000
4.	St. aureus Wood-46	300	500	2000
5.	Scigella sonnei N 1188	500	1000	2000
6.	Scigella sonnei OKL N 20044	1000	1000	2000
7.	Providencia rettgeri № 979	2000	1000	2000
8.	Morganella morganii NCTC N 235	400	500	1000
9.	Proteus mirabilis H 237	300	1000	2000
10.	Proteus vulgaris NCTC N 4145	1000	1000	2000
11.	Proteus vulgaris T.4 N 18	1000	2000	2000
12.	Proteus vulgaris T.2 N 31	2000	1000	2000
13.	Proteus vulgaris № 273	500	500	2000

Примечание:

1. Срок наблюдения посевов 2 суток.
2. Культура выращена на универсальной питательной среде.
3. Культура выращена на сывороточном бульоне.
4. Определение чувствительности проводилось на 5 %-ном кровяном агаре.

Таблица 7

Спектр антимикробной активности сублимата из шрота лаванды настоящей

и препарата сравнения - калефлона (n=5)

№	Тест-культуры	Антимикробная активность, мкг/мл	
		сублимат водного извлечения из шрота лаванды настоящей	препарат сравнения - калефлон
1.	Staph. aureus Macarov	400	не активен
2.	Staph. aureus Lossmanov	500	-"
3.	Staph. aureus Wood – 46	300	-"
4.	Scigella sonnei OKL 20044	500	-"
5.	Morganella morganii NCTC 235	400	-"
6.	Proteus mirabilis H 237	300	-"
7.	Pseudomonas aeruginosae t.4 N 18	1000	-"
8.	Pseudomonas aeruginosae N 273	500	-"
9.	Bacillus subtilis-2	500	-"

Крыс предварительно обучали избегать электроболевого раздражение с упрочением долгосрочных рефлексов. Запись показателей латентного периода реакции избегания проводилась автоматически на счетчике прибора в условных единицах.

Вещество по заявляемому способу растворяли в дистиллированной воде и вводили внутривенно в дозе 500 мг/кг. Препаратом сравнения служил масляный экстракт валерианы (1:1). Масляный экстракт валерианы вводили внутривенно в дозе 500 мг/кг. Латентный период реакции избегания фиксировали в исходном состоянии и через 60 мин после введения препарата. В экспериментах было использовано 15 особей нелинейных белых крыс массой 250-300 г.

Результаты исследований приведены в табл. 8.

Таблица 8
Влияние вещества по заявляемому способу на динамику упроченного двигательного-оборонительного рефлекса у крыс (n=15)

Препарат	Латентный период избегания в % к контролю		Р
	М	м	
Вещество по заявляемому способу	32.4	1.2	< 0.001
Экстракт валерианы	22.3	0.6	-

Таким образом, седативное действие исследуемого препарата превышает действие препарата растительного происхождения - экстракта валерианы.

Известно, что лаванда настоящая и ее шрот содержат значительное количество полифенолов (Петков В. Фитотерапия. - София, Медицина и физкультура, 1988. - С. 350), что позволяет прогнозировать у нее наличие антиоксидантной активности (АОА).

АОА определяли по методике Семенова В.Л. и Ярош Л.М. (Лабораторное дело. - 1988. - № 5. - С. 59-62.), основанной на принципе изменения скорости торможения индуцированного ионами Fe окисления модельной системы - суспензии желточных липопротеидов - путем регистрации образующихся активных продуктов, производных тиобарбитуровой кислоты (ТБК-активных). Перекисное окисление липидов (ПОЛ) инициировали добавлением к суспензии 1 мл 2.5 мМ раствора Fe, пробы инкубировали при температуре 37°C в течение 15 мин, затем центрифугировали 15 мин со скоростью 3000 об/мин. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре марки СФ-16 при $\lambda = 532$ нм, толщине слоя кювета 1 см и светофильтре № 6. Если исследуемые растворы получались мутные, то их осветление проводили путем добавления 2 мл хлороформа с последующим центрифугированием и затем в водной среде определяли оптическую плотность. Расчет производили по известной формуле (Лабораторное дело. - 1988. - № 5. - С. 59-62). Результаты определений АОА препаратов выражали в процентах торможения скорости образования ТБК-активных продуктов или в нМ малонового диальдегида (МДА).

В качестве препаратов сравнения использовали 30%-ный витамин Е и 5%-ный витамин С. Результаты эксперимента показали, что процент снижения МДА в гомогенате яичного желтка у препаратов лаванды настоящей сравним с показателями у витаминов Е и С.

Результаты исследований приведены в табл. 9 и 10.

Таблица 9
Результаты сравнения антиоксидантной активности сублиматов лаванды настоящей

и витамина Е (n = 5)

№	Препарат	Антиоксидантная активность	
		скорость торможения ПОЛ, нМ МДА/г сек	по отношению к препарату сравнения, %
1.	Вещество по заявляемому способу	59.6	109.0
2.	Сублимат водного извлечения из нативного растения лаванды настоящей	67.4	123.0
3.	Сублимат 40 % этанольного извлечения из шрота лаванды настоящей	83.1	151.0
4.	Витамин Е	54.9	100.0

Исследование острой токсичности препаратов лаванды настоящей проведено на 100 особях белых поспородных мышей массой 16-20 г (по 30 мышей на каждый из трех препаратов, плюс 10 особей на контроль). Вещества растворяли в физиологическом растворе и вводили трижды внутривенно по возрастающей дозе. Наблюдение за животными вели в течение 5 суток. Значение смертельной дозы (LD) определяли по методу Kerbery. (Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Рига. 1959. - С. 43-45). Введение препаратов лаванды настоящей в диапазоне доз до 4.700 мг/кг не вызвало гибели животных. LD предлагаемого средства составляет 4.700 мг/кг, что указывает на его безвредность.

Таблица 10

Результаты сравнения антиоксидантной активности сублиматов лаванды настоящей
и витамина С (n=5)

№	Препарат	Антиоксидантная активность	
		скорость торможения ПОЛ, нМ МДА/г сек	по отношению к препарату сравнения, %
1.	Вещество по заявляемому способу	1.54	106.0
2.	Сублимат водного извлечения из нативного растения лаванды настоящей	1.74	120.0
3.	Сублимат 40 % этанольного извлечения из шрота лаванды настоящей	2.18	150.0
4.	Витамин С	1.45	100.0

Исследование стабильности предлагаемого средства и установление срока годности в процессе хранения оценивали по количественному содержанию биологически активных веществ, исследованию структурно-механических и физико-химических параметров, а также по биологической активности с интервалом 0.5 года. Препарат хранили в защищенном от света месте при температуре 16-23°C во флаконах, закупоренных под обкатку, т.е. герметически и "под обвязку", что имеет значение для создания условий хранения на практике. Независимо от способа закупорки, препарат сохраняет доброкачественность в течение 3-х лет. Количественное содержание флавоноидов (3.10±0.01%) и дубильных веществ (12.20±0.01%) в течение этого срока в сублимате водного извлечения из шрота лаванды настоящей при влажности препарата 3-5% остается неизменным.

Способ поясняется следующим примером. 50.0 кг шрота лаванды настоящей экстрагируют в течение 3 ч в 500.0 л горячей воды (температура 80-100°C) при одновременном измельчении сырья в среде экстрагента до размера 2-5 мм на оборудовании РТ-100 (Украина), извлечение фильтруют, жидкую фракцию дозированно разливают во флаконы объемом 10 мл (высота столба жидкости 5.0±0.5 см) и подвергают сублимации в автоматическом режиме в интервале температур от -25°C до +45°C и давления 1 атм на оборудовании: замораживатель марки А 650/40(50) (Чехия), сублиматор марки TG 50-4 (Германия), закупоривают.

Получают 10,5 кг мультidisперсного легкого порошка желто-коричневого цвета с характерным запахом лаванды настоящей. Выход целевого продукта по данному способу составляет 21,0%.

Таким образом, заявляемый способ позволяет получить полифункциональное лечебное средство, обладающее одновременно противовоспалительным, антимикробным, седативным и антиоксидантным действием. Широкий спектр биологической активности позволяет использовать его как аналог препаратов календулы, ротока, амидопирин; настоев и отваров таких растений, как календула, зверобой, шалфей, ресурсы которых весьма ограничены. Кроме того, для производства препарата предлагается использовать

сложившуюся гарантированную и имеющую тенденцию к росту сырьевую базу промышленно возделываемой культуры, путем внедрения малоотходной технологии.

Ежегодно в СНГ перерабатывается около 600 тыс. т. соцветий лаванды, содержание в которой эфирного масла около 1%, что и характеризует степень использования сырья (Производственный технологический регламент масла эфирного лавандового. Госагропром УССР), основная же растительная масса, содержащая практически весь комплекс биологически активных веществ, идет в отходы и в настоящее время не используется.

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03
