

Винахід відноситься 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 засоби на основі рослинної сировини мають ряд переваг перед синтетичними препаратами: максимально наближені до організму людини за біологічною природою вони практично не мають побічної дії, відзначаються зниженою алергенністю і токсичністю, можливістю тривалого використання без формування звикання та залежності.

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

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

Недоліком наведеного способу можна вважати його відносно високу тривалість.

Відомий також спосіб одержання поліфенольного комплексу „Флавітін” з протизапальною, анальгетичною, противиражковою та антиоксидантною активністю [2] шляхом екстракції 50 % спиртом етиловим листя винограду, краще сорту Дабуга, при співвідношенні сировина: 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.

Найближчим до заявленого є спосіб одержання суми поліфенолів [3] з суплідь вільхи клейкої, які дрібно екстрагують 70 % етанолом протягом 12 годин при співвідношенні сировина : екстрагент 1:6 - 1:8. Об'єднаний сумарний екстракт впарюють, фільтрують, обробляють етилацетатом у співвідношенні сировина: екстрагент 1:1 - 1:1,5 та впарюють до сухого залишку. До спектру фармакологічної активності одержаного екстракту не входить діуретична дія.

Завданням винаходу є створення способу одержання суми поліфенолів з рослинної сировини, який шляхом спиртової екстракції суплідь душекії зеленої *Duschekia viridis* при заданих параметрах способу забезпечує одержання екстракту з вираженою антимікробною, протизапальною та діуретичною активністю.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі одержання суми поліфенолів з антимікробною, протизапальною та діуретичною активністю шляхом дробного екстрагування 70% спиртом етиловим суплідь рослин родини березових з подальшим упарюванням і обробкою етилацетатом сумарного екстракту та сушкою, винаходом передбачено, що екстрагують супліддя душекії зеленої *Duschekia viridis* протягом 13-15 годин при співвідношенні сировина: екстрагент 1:9- 1:11, а обробку етилацетатом проводять при співвідношенні сумарний екстракт: етилацетат 1:2.

В якості рослинної сировини обрані стиглі супліддя душекії зеленої *Duschekia viridis* родини березових, яка розповсюджена на території Західної України, зарослі цієї рослини займають 4%-6% площі Українських Карпат.

Саме вибір виду рослинної сировини у поєднанні з заданими параметрами способу обумовлює одержання кінцевого продукту з необхідним спектром фармакологічних активностей, 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 душекії зеленої [4].

Авторами вперше було виявлено діуретичну активність суми поліфенолів суплідь *Duschekia viridis*, одержані заявленим способом.

Вибір в якості екстрагенту спирту етилового було здійснено експериментальним шляхом, виходячи з умов максимальної екстракції поліфенольних сполук з вибраної сировини. Оптимальним екстрагентом для заявленого способу є 70 % спирт етиловий.

У процесі досліджень були визначені також співвідношення сировини до екстрагенту, час екстракції, співвідношення сумарного екстракту до етилацетату. Дані експериментів наведено у таблицях 1 -3.

Таблиця 1  
Визначення співвідношення сировина : екстрагент при екстракції суплідь душекії зеленої 70 % спиртом етиловим у відповідності з заявленим способом

| № досліджу | Співвідношення сировина:<br>екстрагент | Вихід готового продукту,<br>% | Вихід діючих речовин, % |
|------------|--|-------------------------------|-------------------------|
| 1          | 1:5                                    | 4,5                           | 35,62                   |
| 2          | 1:9                                    | 5,0                           | 38,75                   |
| 3          | 1:10                                   | 5,62                          | 41,54                   |
| 4          | 1:11                                   | 5,60                          | 41,53                   |
| 5          | 1:12                                   | 5,60                          | 41,53                   |

Згідно з експериментом 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 суплідь душекії зеленої 70% спиртом етиловим при співвідношенні сировина: екстрагент 1:10

| № досліду | Час екстракції, години | Вихід готового продукту, % | Вихід діючих речовин, % |
|-----------|------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 1         | 12                     | 4,23                       | 38,55                   |
| 2         | 13                     | 5,0                        | 40,45                   |
| 3         | 14                     | 5,62                       | 41,54                   |
| 4         | 15                     | 5,60                       | 41,54                   |
| 5         | 16                     | 5,60                       | 41,54                   |

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 і є економічно недоцільним. Оптимальний час екстракції - 14 годин.

Таблиця 3

Визначення співвідношення сумарний екстракт : етилацетат у відповідності з заявленим способом

| № досліду | Співвідношення сировина-екстрагент | Вихід готового продукту, % | Вихід діючих речовин, % |
|-----------|------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 1         | 1:1                                | 4,46                       | 37,23                   |
| 2         | 1:1,5                              | 5,22                       | 39,48                   |
| 3         | 1:2                                | 5,62                       | 41,54                   |
| 4         | 1:2,5                              | 5,61                       | 41,54                   |
| 5         | 1:3                                | 5,62                       | 41,54                   |

Експериментальним шляхом встановлено, що для заявленого способу оптимальними співвідношенням сумарного екстракту до етилацетату є 1:2. Зменшення цього співвідношення не забезпечує максимального виходу готового продукту і діючих речовин, збільшення недоцільне за причинами, аналогічними наведеним вище.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином: стиглі супліддя душекії зеленої подрібнюють до розміру частин 0,5-1,0 мм, дрібно екстрагують 70% етиловим спиртом у співвідношенні сировина-екстрагент 1:9 -1:11 протягом 13-15 годин упарений екстракт обробляють етилацетатом у співвідношенні 1:2, з подальшим видаленням розчинника та упарюванням до сухого залишку. Вихід готового продукту 5,62%.

Одержаний продукт - негігроскопічний аморфний порошок зелено-коричневого кольору зі слабким характерним запахом, слабо розчинний у воді, хлороформі та ефірі.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1

2кг подрібнених (подрібненість 0.5-1мм) суплідь душекії зеленої (*Duschekia viridis*) екстрагували 10л 70% спирту етилового в типовому екстракторі ємністю 15 л з мішалкою та несправжнім дном на протязі 14 годин. Екстракт в об'ємі 6 л зливали, а сировину промивали 2л 70% етилового спирту. Екстрагування проводили за тими ж умовами двічі новими порціями екстрагенту, додаючи кожного разу 5 л 70% етилового спирту, зливаючи 4 л екстракту і промиваючи сировину 2л 70% етилового спирту. Усі зливи об'єднували та впарювали до повного вилучення спирту. Об'єм кубового залишку становив 5 л. Для вилучення смолистих речовин, які випадають при упарюванні ( випадає 70 г, що складає 3,5% від ваги завантаженої сировини), охолоджений сумарний екстракт фільтрували через нутч-фільтр. Фільтрат обробляли у скляному реакторі, з мішалкою (частота обертання 100 об/хв.) 5 разів по 2 л етилацетатом. Тривалість кожної екстракції становила 20 хвилин. Етилацетатні витяжки об'єднували та впарювали у вакуумі досуха. Отримали 112,4 г сухого цільового продукту, що у перерахунку до провітряно-сухої сировини складає 5,62%.

Дослідження біологічної активності суми поліфенолів, отриманої запропонованим способом, були проведені *in vitro* та *in vivo* і показали, що одержані поліфенольні сполуки мають виражену антимікробну, протизапальну та діуретичну дію.

Приклад 2

Для вивчення антимікробної активності суми поліфенолів, одержаної за заявленим способом, був використаний метод серійних розведень у поживних середовищах. Для оцінювання активності застосовували рекомендовані ВООЗ штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* 2593 ATCC, *Escherichia coli* 27853 ATCC, *Proteus vulgaris* 4636 ATCC, *Proteus aeruginosa* 27853 ATCC, *Bacillus subtilis* 6633ATCC I *Candida albicans* 885/653ATCC.

Визначення антимікробної активності досліджуваної суми поліфенолів проводили методами серійних розведень та дифузії в агар. В якості препарату порівняння було обрано "Новоіманін".

Таблиця 4

Вивчення антибактеріальної активності суми поліфенолів суплідь душекії зеленої методом серійних розведень

| Варіант досліду   | Мінімальна подавляюча концентрація мкг/мл |                   |                      |                         |                      |                         |
|-------------------|---|-------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
|                   | Тест-культура мікроорганізмів             |                   |                      |                         |                      |                         |
|                   | S. aureus 2593 ATCC                       | E.coli 27853A TCC | P. vulgaris 4636ATCC | P.aerugmos a 27853 ATCC | B. subtilis 6633ATCC | C.albicans 885/653 ATCC |
| Сума Поліфен олів | 3500                                      | 2000              | 2500                 | 400                     | 1000                 | 250                     |
| Ново іманін       | 500                                       | 1000              | 1000                 | 500                     | 500                  | 120                     |

Таблиця 5

Вивчення антибактеріальної активності суми поліфенолів суплідь душекії зеленої методом дифузії

| Варіант досліджу | Діаметр зон затримки росту мікроорганізмів в мм ± мм |                   |                      |                         |                      |                         |
|------------------|--|-------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
|                  | Тест-культура мікроорганізмів                        |                   |                      |                         |                      |                         |
|                  | S.aureus 2593AT CC                                   | E.coli 27853AT CC | P.vulgaris 4636ATC C | P.aeruginosa 27853 ATCC | B.subtilis 6633 ATCC | C.albicans 885/653 ATCC |
| Сума поліфенолів | 24,8±1,4   | 22,3±1,2          | 20,7±0,7             | 19,1 ±0,6               | 18,6±0,8             | 15,6±0,6                |
| Новоіманін       | 17,1±1,2   | 16,2±0,6          | 15,6±0,8             | 13,5±1,1                | 14,2±0,9             | 12,3±0,8                |

Аналіз даних таблиць 4 і 5 свідчить про виражену антимікробну дію суми поліфенолів, отриманих з суплідь душекії зеленої заявленим способом.

#### Приклад 3

Протизапальну активність суми поліфенолів, одержаних за заявленим способом, вивчали на моделі гострого запального набряку, викликаного субплантарним введенням у задню лапку щура 0,1 мл 2% розчину формаліну. Об'єм лапки вимірювали за допомогою онкометра до початку досліджу та у момент максимального розвитку набряку (4 години). Суму поліфенолів та препарат порівняння анальгін вводили внутрішньо-шлунково за 30 хвилин до введення флогенного агенту. Протизапальну активність розраховували за формулою:

$$A = \frac{Y_k - Y_0}{Y_k} \times 100, \text{ де}$$

A - протизапальна активність, %

Y<sub>k</sub> і Y<sub>0</sub> відповідно об'єм лапки в контролі та в досліді.

Результати, досліджу представлені в табл.6.

Таблиця 6

Протизапальна активність суми поліфенолів у порівнянні з анальгіном (n=7)

| Умови досліджу   | Доза, мг/кг | Приріст об'єму лапки за 4 години |                              | % до контролю | Протизапальна активність, % |
|------------------|-------------|----------------------------------|------------------------------|---------------|-----------------------------|
|                  |             | M±m (мм)                         | довірчий інтервал при p=0,05 |               |                             |
| Сума поліфенолів | 10          | 1,32±0,10                        | 1,07 ± 1,57                  | 88,0          | 12,0                        |
|                  | 20          | 1,21 ±0.06                       | 1,08 ±1,34                   | 80,7          | 19,3                        |
|                  | 30          | 1,15 ±0,05*                      | 1,02 ± 1,28                  | 76,7          | 23,3                        |
|                  | 40          | 1,05 ±0,07*                      | 0,88 ± 1,22                  | 70,0          | 30,0                        |
|                  | 50          | 1,26 ±0,08*                      | 1,06 ± 1,46                  | 84            | 16,0                        |
| Анальгін         | 50          | 0,94 ± 0,09*                     | 0,72 ± 1,164                 | 62,7          | 37,3                        |
| Контроль         | -           | 1,50±0,11                        | 1,23 ± 1,77                  | 100           | -                           |

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

Таким чином у досліді сума поліфенолів найбільшу протизапальну активність проявляла в дозі 40 мг/кг, яка викликала пригнічення розвитку експериментального набряку лапок у білих щурів на 30% за ступенем протизапальної активності. Суму поліфенолів можна порівняти з протизапальною дією анальгін.

#### Приклад 4

Вивчення діуретичної активності суми поліфенолів душекії зеленої проводили на білих щурах-самцях масою 120 - 170 г за методом Е.Б.Берхіна. Дослідних тварин було поділено на 4 групи по 7 щурів. При вивченні водного діурезу щурів утримували на постійному харчовому раціоні при вільному доступі до води. У цей період тварин годували тільки зернами пшениці. До водного навантаження (3% від маси тіла) білих щурів протягом 2-3 годин позбавляли води та їжі. Тваринам 3-х дослідних груп вводили перорально суму поліфенолів душекії зеленої та препарати порівняння гіпотіазид та настой хвою польового відповідно. Одночасно проводили контрольні дослідження на тваринах з аналогічним водно-харчовим раціоном, яким замість досліджуваних препаратів вводили розчинник у тому же об'ємі. Після цього тваринам до шлунку за допомогою зонду вводили водне навантаження в кількості 3% від маси тіла. Відразу ж після водного навантаження дослідних тварин поміщали до індивідуальних кліток, пристосованих для збору сечі. Кількість сечі враховували щогодини протягом 4 годин. Кількість сечі, виділеної контрольною групою тварин, приймали за 100%.

Результати дослідів представлені в табл. 7.

Таблиця 7

Діуретична активність суми поліфенолів душекії зеленої (n=7)

| Умови досліджу                   | Доза, мл/кг | Діурез через |               |             |               |
|----------------------------------|-------------|--------------|---------------|-------------|---------------|
|                                  |             | 2 години     |               | 4 години    |               |
|                                  |             | мл           | % до контролю | мл          | % до контролю |
| Сума поліфенолів душекії зеленої | 25          | 5,18±0,08*   | 151,0         | 6,41 ±0,09* | 165,2         |
|                                  | 50          | 5,74±0,06*   | 167,3         | 6,97±0,08** | 179,6         |
|                                  | 75          | 5,98±0,10*   | 174,3         | 7,24±0,05*  | 186,6         |
|                                  | 100         | 5,19±0,11    | 151,1         | 6,41±0,09*  | 165,2         |

|              |          |            |       |            |       |
|--------------|----------|------------|-------|------------|-------|
| Гіпотіазид   | 50       | 4,97±0,10* | 144,9 | 6,64±0,09* | 171,1 |
| Настой хвощу | 3мл/100г | 5,20±0,12  | 151,6 | 6,16±0,14* | 158,8 |
| Контроль     | 3мл/100г | 3,43±0,11  | 100   | 3,88±0,10  | 100   |

Примітка. \* і \*\* - вірогідність результатів при  $p < 0,05$  і  $p < 0,01$  у порівнянні з контрольною групою.

За даними експерименту максимальна діуретична активність суми поліфенолів душекії зеленої спостерігалось у дозі 75 мг/кг. Аналіз даних табл. 7 показав, що за діуретичною активністю досліджена сума поліфенолів перевищує препарати порівняння гіпотіазид та настій хвощу польового на 15,5 % та 27,8 % відповідно.

Експериментальними дослідженнями гострої токсичності суми поліфенолів, одержаних за заявленим способом, доведено, що відповідно до класифікації К.К.Сідорова її можна віднести до малотоксичних речовин.

Таким чином заявлено спосіб одержання суми поліфенолів з доступної сировини - суплідь душекії зеленої з вираженою антимікробною, протизапальною та діуретичною 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 в якості субстанції для створення препаратів у різних лікарських формах.

#### Джерела інформації

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

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

3. Патент 16618, Україна, МПК7 А61К 35/78 Спосіб одержання суми поліфенолів. Заявка 393516/SU, Заявл. 22.07.85. опубл. 29.08.97 Бюл. №4.

4. Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека. - М. Наука, 1984.-160 с.