



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **125676** (13) **U**
(51) МПК

A61K 36/45 (2006.01)

A61K 127/00 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 10031**
(22) Дата подання заявки: **17.10.2017**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.05.2018**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.05.2018, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):
Дарзулі Наталя Петрівна (UA),
Грошовий Тарас Андрійович (UA),
Вронська Людмила Вікторівна (UA),
Покришко Олена Володимирівна (UA),
Соколова Катерина Віталіївна (UA),
Подплетня Олена Анатоліївна (UA),
Залигіна Євгенія Володимирівна (UA)

(73) Власник(и):
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ
ЗАКЛАД "ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ
ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ
УКРАЇНИ",
вул. Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001 (UA),
ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД
"ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА
АКАДЕМІЯ МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ
ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ",
вул. Володимира Вернадського, 9, м. Дніпро, 49044 (UA)

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ РОСЛИННОЇ СУБСТАНЦІЇ З ДІУРЕТИЧНОЮ ТА АНТИМІКРОБНОЮ АКТИВНІСТЮ

(57) Реферат:

Спосіб одержання рослинної субстанції з діуретичною та антимікробною активністю, зокрема з листя грушанки круглолистої (*Pyrola rotundifolia* включає технологічний етап екстрагування етиловим спиртом 80 % методом модифікованої ремацерації з перемішуванням.

UA 125676 U

Корисна модель належить до фармації і медицини, а саме способів одержання екстракційних препаратів з лікарської рослинної сировини, що мають діуретичну та антимікробну активність.

5 Засоби рослинного походження є актуальними та доцільними в лікуванні багатьох захворювань, тому що мають ряд переваг, в першу чергу, малу токсичність, відсутність, як правило, побічних ефектів, можливість тривалого застосування та доступність сировини [1].

Відомий спосіб отримання екстрактів з рослинної сировини [2] не передбачає критеріїв контролю щодо вилучення біологічно-активних речовин та дослідження їх фармакологічного впливу, що не дозволяє використовувати даний спосіб для одержання екстрактів у
10 фармацевтичній галузі.

Відомий спосіб одержання екстракту з листя плюща звичайного [3] дозволяє отримати екстракт лише в лабораторних умовах. Даний спосіб не дозволяє перенести виготовлення екстракту в промислові умови, тому що при отриманні рідкого екстракту використовують зворотний холодильник, який неможливо використати для отримання промислових зразків
15 екстракту, а процес екстракції 70 % спиртом при 90-95 °С є небезпечним без чітко прописаного методу екстракції. Також експериментально не обґрунтована концентрація екстрагенту, який використовується для отримання екстракту.

В медицині настій та відвар листя грушанки круглолистої використовуються як антимікробний та діуретичний засіб [1]. Екстрагування водою не дозволяє вилучити комплекс
20 біологічно активних речовин, що мають антимікробний та діуретичний ефект в максимальній кількості. Також відвари та настої є нестійкими при зберіганні та не можуть бути використані при розробці лікарських засобів промислового виробництва.

Спосіб отримання сухого екстракту з грушанки круглолистої з діуретичною та антимікробною активністю має ряд переваг. Описаний спосіб одержання екстракту передбачає технологічний
25 етап екстрагування спиртом етиловим 80 % методом модифікованої ремацерації з перемішуванням, що дозволяє максимально вилучити біологічно-активні речовини та отримати сухий екстракт в промислових умовах, для подальшої розробки лікарських засобів.

Сукупність ознак корисної моделі є суттєвою, оскільки відповідає очікуваному технічному
30 результату.

Приклади, що наведені нижче, ілюструють аспекти корисної моделі. В них представлені експериментальні дані, які свідчать про ефективність екстракції та переваги сухого екстракту з
листа грушанки круглолистої.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробки технологічних прийомів одержання
35 сухого екстракту, які спрямовані на максимально повне вилучення біологічно активних речовин із рослинної сировини та мають певний вид фармакологічної активності.

При вирішенні задачі корисної моделі було взято до уваги результати попередньо
проведених досліджень щодо впливу концентрації спирту етилового у водно-спиртових сумішах на якісний склад і кількісний вміст біологічно активних речовин.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання рослинної субстанції з
40 діуретичною та антимікробною активністю, зокрема з листя грушанки круглолистої (*Pyrola rotundifolia*), що включає технологічний етап екстрагування спиртом етиловим, згідно з корисною моделлю, екстракцію проводять етиловим спиртом 80 % методом модифікованої ремацерації з перемішуванням.

В ході попередніх досліджень екстрагування проводили спиртом етиловим 30 %, 40 %, 50 %, 45
60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % та спектрофотометричним методом визначали в кожній із одержаних субстанцій кількісний вміст флавоноїдів, та гравіметричним методом - екстрактивних речовин. В процесі експерименту нами було встановлено, що для отримання екстракту з листя грушанки круглолистої (*Pyrola rotundifolia*) з найбільш повним вилученням екстрактивних речовин - флавоноїдів, оптимальним є використання як екстрагенту спирту етилового 80 %, і
50 екстрагування подрібненої рослинної сировини у співвідношенні "сировина:екстрагент" 1:10 методом модифікованої ремацерації з перемішуванням. Також у ході комплексного фітохімічного дослідження листя грушанки круглолистої (*Pyrola rotundifolia*) нами був встановлений якісний склад і кількісний вміст біологічно активних речовин - комплексу фенольних сполук (флавоноїдів та поліфенолів), що можуть здійснювати вплив на сечовидільну
55 систему, а одержана рослинна субстанція у вигляді сухого екстракту з листя грушанки круглолистої (*Pyrola rotundifolia*) є перспективною для застосування як антимікробного засобу з діуретичною активністю.

Спосіб одержання сухого екстракту з листя грушанки круглолистої (*Pyrola rotundifolia*) з діуретичною та антимікробною активністю, передбачає технологічний етап екстрагування
60 спиртом етиловим 80 % методом модифікованої ремацерації з перемішуванням. Подрібнену

рослинну сировину завантажують в мацератор та замочують достатньою кількістю екстрагенту протягом 4 год., після чого заливають екстрагентом у співвідношенні 1:10 та настоюють при кімнатній температурі протягом 9 год. при періодичному перемішуванні. Витяжку зливають в наступний мацератор і знову подають на сировину, повторюючи цикли екстракції 6 разів для

5 максимального виснаження сировини.

Співвідношення "сировина:екстрагент" становить 1:10, що є необхідним і достатнім для здійснення процесу екстракції. Здійснення настоювання при температурі 20 °С сприяє збереженню термолабільних екстрактивних речовин та дозволяє уникнути додаткових витрат енергоносіїв.

10 Спосіб здійснюють наступним чином. Подрібнену до розміру частинок, які проходять крізь сито з діаметром отвору № 11200 (з максимальним допуском для отвору 0,77 мм), рослинну сировину (з листя грушанки круглолистої *Pyrola rotundifolia*), змочують достатньою кількістю (100 мл) спирту етилового 80 %, залишають на 4 год. при кімнатній температурі для набухання. Потім сировину заливають етиловим спиртом 80 % у співвідношенні 1: 10, настоюють протягом

15 9 год. при температурі 20 °С, періодично перемішуючи. Витяжку зливають і знову подають на сировину, перемішують і настоюють протягом 9 год. Для максимального виснаження сировини екстрагування проводять 6 разів по 9 год. Спирто-водний екстракт зливають, шрот віджимають, фільтрують крізь паперовий фільтр, згущують до 1:5 об'єму і висушують на полицховій сушарці до стану максимально сухого екстракту. Сухий екстракт подрібнюють та просіюють через сито.

20 При цьому загальне співвідношення "сировина:готовий продукт" становить 4,1:1 (1 г сухого екстракту відповідає 4,1 г рослинної сировини).

Приклад 1

100 г подрібнених до розміру частинок, які проходять крізь сито з діаметром отвору № 11200, листя грушанки круглолистої (*Pyrola rotundifolia*) змочували достатньою кількістю (100

25 мл) екстрагенту (спирту етилового 80 %) поміщали в мацератор і залишали на 4 год. при кімнатній температурі для набухання. Потім замочену сировину заливали 900 мл спирту етилового 80 %, настоювали протягом 9 год. при кімнатній температурі при періодичному перемішуванні. Після першого циклу екстрагування витяжку подавали на сировину в наступному мацераторі, перемішували і настоювали протягом 9 год. Для максимального

30 виснаження сировини екстрагування проводили 6 разів по 9 год. Отриману спиртово-водну витяжку зливали, шрот віджимали та фільтрували крізь паперовий фільтр. Згущували шляхом упарювання при температурі 50 °С. Згущену спиртово-водну витяжку висушували на полицховій сушарці до одержання сухого екстракту при температурі 50 °С. Вихід сухого екстракту складав 24,39 %, загальне співвідношення "сировина:готовий продукт" становило 4,1:1 (1 г сухого

35 екстракту відповідає 4,1 г рослинної сировини).

Отриманий готовий продукт - сухий екстракт - сипучий кристалічний порошок темно-коричневого кольору, гіркого смаку, зі своєрідним приємним запахом і вологістю не більше 5 %, слабо розчинний у теплій воді, нерозчинний в хлороформі, добре розчинний у 96 % спирті етилового.

40 Приклад 2

Дослідження антимікробної активності сухого екстракту з листя грушанки круглолистої (*Pyrola rotundifolia*) проводили в умовах *in vitro* згідно з ДФУ [4]. Для досліджень використовували сухий екстракт грушанки круглолистої, отриманий з листків дикорослої рослини даного виду.

45 Дослідження антибактеріальної й антифунгальної дії сухого екстракту на життєдіяльність мікроорганізмів проводили методом двократних серійних розведень в рідкому поживному середовищі (м'ясо-пептонний бульйон) та дифузії в агар (метод "колодязів"). У експерименті використовували стандартизовану добову суспензію тест-штамів наступних мікроорганізмів: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538,

50 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 та *Candida albicans* ATCC 885-653, концентрація клітин в яких становила 0,5 за McFarland. Дослідження проводилися в 10-кратній повторності. Стандартизацію умов досліджень "методом колодязів" при дифузії в агар забезпечували товщиною середовища 10 мм та діаметром "колодязя" у ньому 6 мм. Після посіву суспензії тест-штаму на поживне середовище "колодязі" заповнювали краплинами сухого екстракту

55 розведеного в м'ясо-пептонному бульйоні. Далі чашки Петрі поміщали в термостат при 37 °С. Облік результатів проводили через 24 год. шляхом вимірювання діаметра зони затримки росту мікроорганізмів навколо "колодязя" у міліметрах. У методі серійних розведень використовували концентрації сухого екстракту грушанки круглолистої від 1:2 до 1:128 (об'ємні співвідношення). В усі пробірки, що містили 2 мл серійно розведеної субстанції, а також в контрольну пробірку (з рідким поживним середовищем) вносили по 0,2 мл однодобової зависі тест-культури

60

мікроорганізмів. Оцінку результатів проводили за ступенем пригнічення росту тієї чи іншої тест-культури мікроорганізмів досліджуваної субстанції у певному розведенні. Антимікробну активність екстракту вивчали методом послідовних серійних розведень, який передбачає визначення мінімальної бактеріостатичної (MIC) та мінімальної бактерицидної концентрацій (МБС). Для визначення MIC готували послідовні двократні розведення речовини в рідкому поживному середовищі, яку згодом визначали за найменшою концентрацією речовини, в присутності якої не спостерігали росту культури. Бактерицидну концентрацію досліджуваних речовин встановлювали за результатами висіву вмісту пробірок з розведеннями на щільні поживні середовища. Статистичний аналіз одержаних результатів проводили методом варіаційної статистики з визначенням середніх значень величин, середньої похибки. Достовірність відмінностей між середніми значеннями під час проведення аналізу оцінювали, використовуючи критерій Стьюдента (t). Відмінність між величинами вважали достовірною, коли ймовірність різниці $p \leq 0,05$.

Результати вивчення антимікробної активності сухого екстракту грушанки круглолистої методом серійних розведень представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Аналіз антибактеріальної активності сухого екстракту
грушанки круглолистої методом серійних розведень

№	Тест-культура мікроорганізмів	Розведення						
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
1	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	+	+	+
2	<i>E. coli</i>	-	-	+	+	+	+	+
3	<i>P. aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	+	+
4	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	+	+
5	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	+	+

Примітка. + - є ріст; - - відсутній ріст; + - є незначний ріст

Як видно з таблиці 1, сухий екстракт грушанки круглолистої проявляє антибактеріальну дію в мінімальному розведенні (1:2) на всі тест-культури мікроорганізмів. Найбільш чутливими до екстракту виявилися грампозитивні коки *S. aureus* та дріжджоподібні гриби *C. albicans*.

Низька чутливість до досліджуваного екстракту є у *P. aeruginosa* та *E. Coli*. Результати вивчення антимікробної активності сухого екстракту грушанки круглолистої методом "колодязів" наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Кількісний аналіз антибактеріальної активності
сухого екстракту грушанки круглолистої методом "колодязів", ($M \pm m$, $n=4$)

Тест-культура мікроорганізмів	Діаметр затримки росту мікроорганізмів під впливом різних розведень сухого екстракту грушанки круглолистої, мм						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<i>S. aureus</i>	22	15	12	11	-	-	-
<i>E. coli</i>	10	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	20	16	15	13	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	10	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	18	15	10	10	-	-	-

Згідно з цим методом підтверджені результати, отримані за допомогою методу серійних розведень. Враховуючи діаметр зон затримки росту *S. aureus* є чутливим до сухого екстракту грушанки круглолистої в розведенні 1:2 і 1:4, малочутливим в розведенні 1:8, 1:16. *B. subtilis* є чутливою до сухого екстракту в розведеннях 1:2, 1:4, 1:8, та малочутливою в розведенні 1:16. Чутливою до екстракту грушанки є *C. albicans* в розведеннях 1:2 та 1:4. Не чутливими до сухого екстракту грушанки є *P. aeruginosa* та *E. coli*, в розведенні 1:2 зона затримки росту складала лише 10 мм.

Приклад 3

Експерименти з дослідження впливу екстракту з листя грушанки круглолистої на сечовидільну функцію нирок [5] проведені на 48 білих статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar масою 200-240 г. Щури були розподілені на 8 груп (n=6): 1 група - контрольні щури, які отримували еквівалентну кількість дистильованої води; 2-7 групи - деалкоголізований екстракт з листя грушанки круглолистої в дозах 50, 75, 100, 125, 150 та 200 мг/кг в об'ємі 1 мл/кг; 8 група - водний розчин препарату "Канефрон Н" в дозі 20 мг/кг та об'ємі 1 мл/кг. За годину після внутрішньошлункового введення досліджуваних препаратів, щури отримували рідинне навантаження з розрахунку 3 мл на 100 г маси тіла. Дослідних тварин поміщали до обмінних кліток для двогодинного збору сечі. Вимірювали загальний об'єм сечі, виділеної тваринами за 1 годину з розрахунку на одиницю маси.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою пакету програм Statistica v.6.1 (Statsoft Inc., США) (ліцензійний № AJAR909 E415822 FA). Основні характеристики наведені у вигляді кількості спостережень (n), середньої арифметичної величини (M), стандартної помилки середньої (т), відносних показників (абс, %), рівня статистичної значущості (р). Порівняння статистичних характеристик у різних групах і в динаміці спостереження проводили для середніх величин за t-критерієм Стьюдента. Зміни вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Отримані дані наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Вплив екстракту з листя грушанки круглолистої на діуретичну реакцію нирок білих щурів в залежності від введеної дози ($M \pm m$, n=6)

Група тварин	Об'єм сечі (мл/100 г за 2 год.),	% змін відносно контрольної групи
Контрольна	1,12±0,11	-
Екстракт #, 50 мг/кг	1,06±0,04	↓5,5 %
Екстракт #, 75 мг/кг	1,22±0,18	↑8,3 %
Екстракт #, 100 мг/кг	1,71±0,08*	↑51,9 %
Екстракт #, 125 мг/кг	0,65±0,06*	↓42,4 %
Екстракт #, 150 мг/кг	0,76±0,04	↓32,8 %
Екстракт #, 200 мг/кг	1,35±0,06*	↑20,1 %
"Канефрон Н", 20 мг/кг	1,36±0,14	↑21,3 %

Примітка: # - сухий екстракт з листя грушанки круглолистої; * - значення, що достовірно вірізняються від даних контрольної групи при $p < 0,05$; n - кількість тварин у групі.

Як випливає з даних, наведених в таблиці 3, одноразове введення білим щурам екстракту грушанки в дозах 50 мг/кг та 75 мг/кг не викликало суттєвого впливу на водовидільну функцію нирок білих щурів, тоді як при введенні екстракту в більш високих дозах, зокрема 100 мг/кг та 200 мг/кг, відмічалась достовірна діуретична дія. Так, на тлі введення дози 100 мг/кг спостерігалось максимальне підвищення діурезу, що перевищувало на 51,9 % показники тварин контрольної групи. При цьому, ефективність екстракту грушанки перевершувала ефективність препарату порівняння: у щурів, які отримували "Канефрон Н" в дозі 20 мг/кг, водовидільна функція підвищувалась на 21,3 %. На тлі введення дози 200 мг/кг зміни відносно контрольної групи становили 20,1 % та були аналогічні змінам в групі щурів на тлі введення препарату порівняння. При введенні екстракту грушанки в дозах 125 мг/кг та 150 мг/кг діуретична функція нирок знижувалась на 42,4 % та 32,8 % відповідно. Враховуючи вірогідну значущість діуретичної ефективності екстракту в дозах 100 мг/кг та 200 мг/кг, в якості експериментально-терапевтичної дози була обрана доза 100 мг/кг.

Джерела інформації, які слід взяти до уваги:

1. Мазепина Л.С. Обоснование применения грушанки - традиционного урологического средства / Л. Мазепина, А. Иванов, Н. Фурса. Вестник Пермской государственной фармацевтической академии.-2010. - № 7. - С. 224-226.

2. Патент 3771С1 UA, МПК В01D 11/00,С09В 61/00, МПК 9/02 (2006.01) Спосіб одержання екстрактів з рослинної сировини / Дженеєв С. Ю., Качура В. І., Гольдман Г. М; заявник Інститут

винограда і вина "Магарач", Крим, Ялта. - № 4841750/SU; заявл. 21.06.1990; опубл. 27.12.1994, бюл. № 6-І/1994.

3. Патент 63489 UA, МПК А61К 35/00 (2011.01) Спосіб одержання сухого екстракту із листя плюща звичайного (*Hedera helix* L.) з комплексною муколітичною, антимікробною та протизапальною активністю / Луценко Ю. О., Гаврилюк О. М., Нектегаєв І. О., Гаврилюк І. М., Дармограй Р. Є.; заявник Луценко Ю. О., Гаврилюк О. М., Нектегаєв І. О., Гаврилюк І. М., Дармограй Р. Є... - № u201103137; заявл. 17.03.2011; опубл. 10.10.2011, бюл. № 19/2011.

4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр" - 1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - Доповнення 1. - 2004. - 520 с.

5. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. - К.: Авіцена, 2001. - 528 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання рослинної субстанції з діуретичною та антимікробною активністю, зокрема з листя грушанки круглolistої (*Rugola rotundifolia*), що включає технологічний етап екстрагування спиртом етиловим, який **відрізняється** тим, що екстракцію проводять етиловим спиртом 80 % методом модифікованої ремацерації з перемішуванням.

20

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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