



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 072 859** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **A 61 K 35/78**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

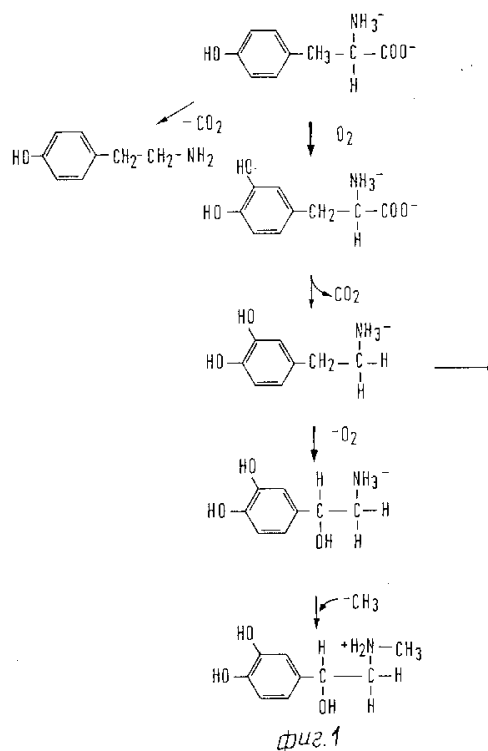
(21), (22) Заявка: 5052267/14, 08.07.1992
(30) Приоритет: 09.07.1991 DE P 4122706.9
(46) Дата публикации: 10.02.1997
(56) Ссылки: Патент Германии N 3618627, кл. А 61 К 35/78, 1987.

(71) Заявитель:
Штайгервальд Арцнайmittelwerk ГмбХ (DE)
(72) Изобретатель: Вернер Шнайдер[DE],
Эрих Ф.Эльстнер[DE], Элизабет Клебер[DE]
(73) Патентообладатель:
Штайгервальд Арцнайmittelwerk ГмбХ (DE)

(54) **РАСТИТЕЛЬНЫЙ ЭКСТРАКТ, ОБЛАДАЮЩИЙ ДОПАМИНЕРГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

(57) Реферат:

Использование: в медицине для смягчения состояний возбуждения и нервных дисфункций. Сущность изобретения: растительный экстракт получен отдельной экстракцией спиртом (2,5:10) *Corydalis* и *Eschscholtzia* с последующим смешением экстрактов при массовом соотношении сухих веществ экстракта *Corydalis* и экстракта *Eschscholtzia* 1:1-20. Предпочтительно объемное соотношение указанных экстрактов равно 1:2-10. Экстракт может представлять собой порошок, содержать фармацевтически приемлемые целевые добавки, представлять собой форму для орального введения, настойку, таблетку, драже или капсулу. Он может быть получен из высушенных растений. 9 з.п. ф-лы, 15 ил., 6 табл.





(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 072 859** ⁽¹³⁾ **C1**
 (51) Int. Cl.⁶ **A 61 K 35/78**

RUSSIAN AGENCY
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 5052267/14, 08.07.1992

(30) Priority: 09.07.1991 DE P 4122706.9

(46) Date of publication: 10.02.1997

(71) Applicant:
 Shtajgerval'd Artsnajmittel'verk GmbH (DE)

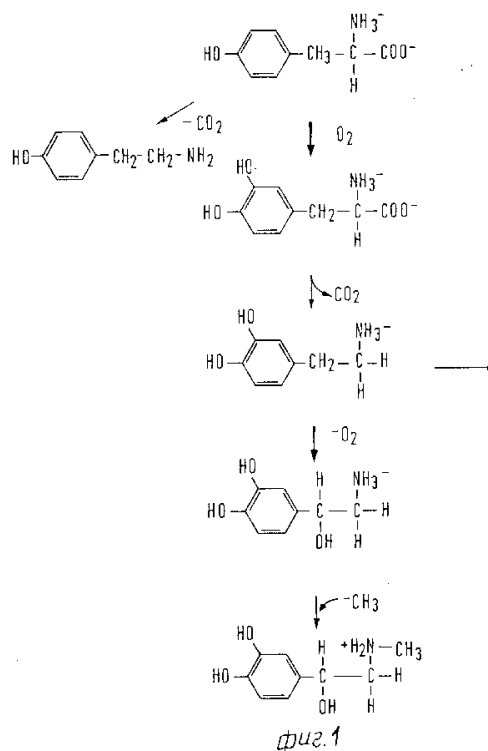
(72) Inventor: Verner Shnajder[DE],
 Ehrikh F.Ehl'stner[DE], Ehlizabet Kleber[DE]

(73) Proprietor:
 Shtajgerval'd Artsnajmittel'verk GmbH (DE)

(54) **PLANT EXTRACT SHOWING DOPAMINERGIC ACTIVITY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, neurology, pharmacy.
 SUBSTANCE: plant extract is prepared by the separate extraction of plants Corydalis and Eschscholtziae with alcohol (2.5: 10) followed by extracts mixing at mass ratio of dry matters of Corydalis extract and Eschscholtziae extract = 1:(1-20). Preferable volume ratio of the indicated extracts = 1:(2-10). Extract can be powder and contain pharmaceutically acceptable special additions and represents form for oral administration, tincture, tablet, dragee or capsule. Extract can be prepared from the dried plants also. EFFECT: improved method of preparing. 15 dwg, 10 cl, 6 tbl



Изобретение относится к растительному экстракту, который может найти применение для смягчения состояния возбуждения и нервных дисфункций.

Известно, что промежуточные и конечные продукты обмена веществ пирокатехоламина оказывают влияние на состояние возбуждения у человека. Так, например, конечный продукт адреналина действует как нейромедиатор адренергической нервной системы как на альфа-, так и на β -рецепторы. Как симпатомиметический препарат адреналин повышает силу сердечного сокращения. Кроме того, так как адреналин повышает окислительный обмен веществ в клетках, он вызывает в итоге повышенную мобилизационную готовность организма. В соответствии с этим наблюдают также увеличение выброса адреналина в ситуациях, вызванных стрессом. Особенно высокие концентрации адреналина и также его предшественники, норадреналин, могут иметь последствием перевозбуждение, нервозность и тем самым недостаточную функциональную способность организма, в то время как лишь немного повышенные величины этих аминов оказывают вполне положительное действие: пульсовый удар и кровяное давление слегка повышены, мускулатура и головной мозг возбуждены, чувствительность повышена.

Кроме того, известно, что нарушения в уровне концентрации дофамина, следующей предшественники к адреналину, могут приводить к состояниям возбуждения к нервным дисфункциям. В частности, при недостатке дофамина могут появляться депрессии. Специальный синдром недостатка дофамина представляет болезнь Паркинсона, частичными симптомами которой являются акинезия, оцепенение и дрожание в покое. Новейшие клинические результаты говорят об терапевтической эффективности допа при лечении паркинсонизма. Это действие становится понятным на основании наблюдаемого уменьшения дофамина в базальных ганглиях.

Таким образом, при недостатке дофамина желательно естественным путем повышать концентрацию этого пирокатехоламина. Этого можно достигнуть повышением синтеза допа (дофамина) и подавлением расщепления дофамина.

Задачей настоящего изобретения является создание лекарственного средства, повышающего концентрацию дофамина в организме пациента.

Указанную задачу, согласно изобретению, решают путем получения растительного экстракта раздельной экстракцией спиртом (2,5:10) *Corydalis* и *Eschscholtzia* с последующим смешиванием экстрактов. При этом массовое отношение сухих веществ экстрактов *Corydalis* и *Eschscholtzia* составляет 1:1-20.

Предпочтительно, чтобы объемное соотношение спиртовых экстрактов *Corydalis* и *Eschscholtzia* составляло 1:2-10 или, что еще предпочтительнее, 1:4.

В частности растительный экстракт может представлять собой смесь экстрактов *Corydalis canae rhizoma* и *Eschscholtziae californicae herba*. Он может представлять собой, в частности, порошок. Растительный экстракт может дополнительно содержать фармацевтически приемлемые целевые

добавки. Он может представлять собой форму для орального введения, может представлять собой настойку, таблетку, драже или капсулу. Растительный экстракт может быть получен из высушенных растений.

Растительный экстракт по изобретению может содержать полученные в результате экстракции спиртом экстракты в форме подвергнутого сушке вымораживанием порошка, водного и/или спиртового раствора. Подвергнутый сушке вымораживанием порошок получают, как правило, сублимационной сушкой полученного в результате экстракции спиртом экстракта (вытяжки из растительного сырья) обычными для этого способами сублимационной сушки.

Подвергнутые сушке вымораживанием экстракты *Corydalis* и *Eschscholtzia* можно хранить отдельно или в смеси, а в случае необходимости для получения лекарственного средства смешивать с подходящими фармацевтическими веществами-носителями/растворителями. Для получения настоек для этого применяют в частности воду и/или спирт. Экстракт содержит, главным образом, активные вещества в форме полученной в результате экстракции спиртом (2,5:10) вытяжки из растительного сырья, и оно состоит, в частности, из такой вытяжки из растительного сырья.

Отношение *Eschscholtzia* к *Corydalis* (в пересчете на вес сухого экстракта) лежит преимущественно в области от 10:1 до 2:1 и составляет особенно 4:1.

В качестве активного вещества применяют согласно изобретению преимущественно экстракты *Corydalis cavae rhizoma* и *Eschscholtziae californicae herba*.

Экстракт, согласно изобретению, может существовать в обычной для орального введения форме, в частности в форме таблеток, драже, капсул или, главным образом, настоек. Получение этих форм введения осуществляют, в случае необходимости, с применением обычных для отдельных форм введения и подходящих фармацевтических растворителей и/или веществ-носителей, обычным методом, например таблетированием, дражированием, капсулированием находящегося в подвергнутой сублимационной сушке форме экстракта или спиртового и/или водного раствора из него. Для получения жидких форм введения, как, в частности, настоек, непосредственно применяют полученные в результате экстракции спиртом спиртовые вытяжки из растительного сырья. Наряду с сублимационной сушкой этих спиртовых вытяжек из растительного сырья для получения подвергнутых сублимационной сушке экстрактов можно также выпаривать досуха непосредственно спиртовые вытяжки из растительного сырья, преимущественно в вакууме и/или в атмосфере инертного газа, и полученный таким путем остаток можно затем обрабатывать дальше в желательную форму введения.

Содержание активных веществ в экстракте согласно изобретению можно изменять в широких пределах. Как правило, оно составляет от 0,5 до 20 мас. в пересчете на готовый состав экстракта, особенно от 1 до 10 мас. главным образом, от 1 до 4 мас. Если применяют полученную в результате

экстракции спиртом (2,5: 10) спиртовую вытяжку из растительного сырья, то последнюю применяют преимущественно в полученной непосредственно после экстракции концентрации; при этом вытяжки из растительного сырья из *Corydalis* и *Eschscholtzia* применяют особенно в таком отношении, чтобы отношение *Corydalis* к *Eschscholtzia* соответствовало предпочтительно названным отношениям.

Для получения отдельных экстрактов *Corydalis* и *Eschscholtzia*, особенно *Coradalis cavae* rhizoma и *Eschscholtzia californicae* herba, применяют высушенные лекарственные растения, которые соответствуют спецификациям DAB 9 (немецкой фармакопеи). Это обеспечивается контролем качества при получении высушенных лекарственных растений.

Получение отдельных экстрактов осуществляют известным образом обычными для этого и стандартными способами экстракции, как например мацерацией или перколяцией при помощи этанола или смеси этанола/воды. При этом сохраняют отношение высушенных лекарственных растений-экстракта 2,5:10, т.е. из 2,5 г высушенного лекарственного растения получают 10 мл экстракта высушенного лекарственного растения. В качестве экстрагирующего агента применяют преимущественно 30 объем. этанола. Получением можно управлять на основании контроля за процессом.

Для оценки и гарантирования постоянного качества экстрактов используют обычные для этого критерии качества. В частности, для этого служат общие спектры экстрагированных веществ и, с другой стороны, анализы известных из литературы основных алкалоидов обоих высушенных лекарственных растений.

Затем освобожденные после контроля качества экстракты в соотношении с желательной формой введения и в соответствии с желательными концентрациями перерабатывают дальше как жидкий или подвергнутый сублимационной сушке экстракт.

Вид и количество экстракта зависит, в частности, от тяжести заболевания, от общего состояния и от возраста пациента. Как правило, количество назначаемого экстракта в форме настойки, которое предпочитают по изобретению, составляет от 1 до 2 капель/кг веса тела, один или несколько раз в день. В форме других оральных форм введения назначают, как правило, соответствующие количества, предпочтительно от 2 до 5 мг общего сухого экстракта/кг веса тела, один или несколько раз в день.

На Фиг. 1 показана форма обмена вещества синтеза пирокатехоламина; на фиг. 2 обзор схемы реакции тирозина через допахинон до допахрома или меланина; на фиг.3 определенное при 303 нм ультрафиолетового спектра гидроксигирование тирозина в присутствии *Corydalis* экстракта 1:10.000, *Eschscholtzia* экстракта 1: 10.000 или 20 Е фенолазы; на Фиг.4 график Lineweaver Burk для реакции фенолазы с *Corydalis* экстрактом (фиг.4 и 5) и для сравнения без *Corydalis* экстракта (фиг.6 и 9); на Фиг.10 передает реакцию фенолазы в присутствии

3,4-дигидроксibenзола; Фиг.11 показывает влияние D,L-допа на реакцию фенолазы при различных концентрациях допа (К контроль); Фиг.12 показывает торможение допамин-b-гидроксилазы

5 *Eschscholtzia*-экстрактом (кривая А) и водным 1%-ным раствором подвергнутых сублимационной сушке экстрактов *Coradalis* и *Eschscholtzia* (кривая В); фиг.13 показывает при помощи фотометра при 24 нм 10 торможение катализированной благодаря аминоксидазе реакции превращения бензиламина до бензальдегида *Corydalis* экстрактом. Фиг.14 показывает торможение катализированного MAO (моноаминоксилазой) образования бензальдегида при 241 нм в 15 зависимости от концентрации экстракта из *Eschscholtzia*; Фиг.15 показывает торможение катализированного MAO образования бензальдегида при 241 нм экстрактами *Eschscholtzia* (А), *Corydalis* (В) и смесью 20 экстрактов *Corydalis* и *Eschscholtzia* в отношении 20:80.

Из фиг.1 видна схема обмена веществ пирокатехинаминов. Появляющиеся при этом соединения Допа и допамина относительно их концентрации, во-первых, зависят от того, 25 как быстро происходит превращение трирозина до допа, и, во-вторых, с какой скоростью допамин реагирует дальше до норадреналина и адреналина. Кроме того, допамин подвергается также расщеплению моноаминоксидазами (MAO), так что и это 30 может оказывать значительное влияние на его концентрацию в обмене веществ.

Как видно из фиг.1, повышенную концентрацию допамина получают, если 35 повышают реакцию фенолоксидазы (фенолаза, тиросиназа), и влияние допамин-b-гидроксилазы и моноаминоксидаз можно уменьшать.

Ниже были приведены эксперименты, которые показывают, в какой степени 40 активные компоненты лекарственного средства по изобретению влияют на три ферментативные реакции.

Следующие исследования, поскольку не было ничего другого, были осуществлены с имеющимися в продаже ферментами и с 45 *Carydalis cavae* rhizoma и *Eschscholtzia californicae* herba.

1. Исследование реакции тирозиназы:

Тирозин при обмене веществ 50 гидроксигируют в расходуемой кислород реакции до L-допа. Эту первую стадию синтеза пирокатехинамина катализирует тирозиназа или фенолаза или фенолоксидаза, которая представляет 55 содержащий медь, мало специфический фермент.

Известно, что фенолазы широко распространены в природе и встречаются в 60 растениях, грибах и в различных животных тканях. Они повсюду играют важную роль там, где окисляют моно- или дифенолы, причем во многих случаях начинаются окислительные реакции полимеризации, как например образование лигнина или меланина.

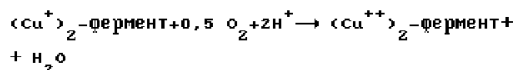
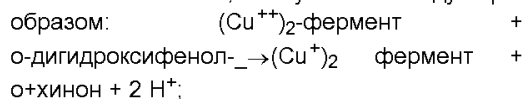
Фенолазы катализируют две следующие друг за другом стадии окисления, которые можно описать следующим образом:

1. "Активность крезолоазы" фермента вызывает гидроксигирование монофенола в орто-положении с образованием дифенола.

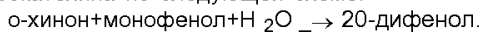
2. "Активность пирокатехинолазы"

катализирует дальнейшее окисление образованного о-диола до соответствующего хинона.

Обе реакции зависят непосредственно друг от друга. Тесная связь реакции крезолазы и реакции пирокатехинолазы основывается на состоянии окисления атома меди в активном центре, который определен по D.Kertesz и R.Zito в O.Hayaishi (Hrsg.) "Oxygenases", Academic Press, Лондон (1962), глава 8: Фенолаза, как указано следующим образом:



В вышеприведенном электронном балансе меди реакция крезолазы остается не учтенной. Фактически, остается неясным, катализируют ли гидроксирование монофенола прямой ферментативной реакцией или эта реакция протекает химическим путем параллельно окислению пирокатехина по следующей схеме:



За гипотезу неферментативной реакции говорит тот факт прежде всего, что при реакции монофенолов с фенолазами можно наблюдать индукционную фазу, которая при тирозиназах из животной ткани может продолжаться до одного часа. Непрерывная ферментативная реакция может начинаться лишь тогда, когда диолы или хиноны присутствуют как примеси или образованы в результате самоокисления.

Исследование реакции тирозиназы с растительными экстрактами из *Corydalis* и *Eschscholtzia*.

Фиг.2 показывает схематический обзор реакции, исходя из тирозина, до допахрома и его превращения до хинонимина или меланина.

Экспериментально наблюдали ниже окисление тирозина до допахрома (фиг.2), первого продукта окисления дигидроксифенилаланина (Допа). Сам допахром является субстратом для допахромтаутомеразы и представляет предстadium образования меланина. Как образование допахрома, так и синтез меланина приводят к расщеплению Допа и тем самым к уменьшенному синтезу допамина.

За концентрацией допахрома можно следить в ультрафиолетовом спектре при длине волны 303-318 нм. При этом его образование из тирозина приравнивается к активности исследуемой фенолазы, которую считают определяющей скорость реакции.

Исследования проводили на следующих смесях субстратов: 2 ммол тирозина, 100 ммол фосфатного буферного раствора, pH 6,5, 20 единиц тирозиназы или спиртовых вытяжек *Eschscholtzia* или *Corydalis*, разбавленных в отношении 1: 10000 (исходя из основного экстракта по нижеследующему примеру).

Фиг.3 показывает определенное при 303 нм ультрафиолетового спектра гидроксирование тирозина в присутствии фенолоксидазы или экстрактов из *Corydalis* и *Eschscholtzia*. При этом наблюдают в

присутствии одной фенолазы появление приблизительно 15-минутной 'Lag-фазы' (стадии покоя).

Разбавления из экстрактов *Corydalis* до 1:10000 приводят к определенному сокращению этой "lag-фазы" или начальной фазы, как это видно из фиг.3. При более высоких концентрациях *Corydalis* наблюдают немедленное наступление максимальной нормы превращения без 'lag-фазы'.

Экстракт из *Eschscholtzia* приводит также к сокращенной начальной фазе: однако эффективность экстракта *Eschscholtzia* лежит значительно ниже эффективности *Corydalis*.

Контрольные опыты показали, что присутствие соответствующих количеств этанола не оказывают никакого влияния на реакцию. Кроме того, опыты с пирролохинолинхиноном (PGG) показали, что добавка этого физиологически очень интересного хинона не оказывает никакого влияния на начальную фазу реакции фенолазы. И гиперин, который как пара-хинон возможно мог бы оказывать влияние на lag-фазу, не влияет на реакцию.

При этой серии опытов интересен тот факт, что экстракт из *Corydalis* хотя и определенно смещает вперед момент максимальной нормы превращения тирозина, но не оказывает никакого влияния на максимальную норму превращения. Опыты с различными концентрациями субстрата на графике Lineweaver Burk Plot не показывают никакого смещения K_m -величины реакции фенолазы (см. для этого фиг. 4-9).

Для дальнейшего пояснения механизма реакции тирозиназы, в частности, учитывая сокращение lag-фазы, к испытываемой исходной смеси добавляют другие вещества:

а) Добавка солей меди не оказывала никакого влияния на ферментативную реакцию.

б) Аскорбиновая кислота как восстанавливающий действующий фактор как это известно из литературы может подавлять стадию покоя при различных типах реакции. Однако этого нельзя было наблюдать в пределах настоящей серии опытов: аскорбиновая кислота хотя и может начинать превращение тирозина до L-допа, но одновременно препятствует его дальнейшему окислению до допахрома. Реакцию фенолазы нельзя было наблюдать в присутствии аскорбиновой кислоты при 303 нм в течение 30 минут; "стадия покоя" была, возможно, даже удлинена.

с) Комбинация PQQ с аскорбиновой кислотой, причем образуется восстановленная форма PQQH₂, которая могла бы влиять на реакцию в качестве диола, так же вызывала удлинение стадии покоя.

д) Добавка настоящих диолов, как 3,4-дигидроксibenзол и D,L-допа (ДОФА-, 3,4-диоксифенилаланина), сокращает стадию покоя реакции (в случае добавки 3,4-диоксифенилаланина, благодаря большему количеству субстрата повышается также скорость образования допахрома).

На фиг.10 показана реакция фенолазы в присутствии 3,4-дигидроксibenзола. Фиг. 11 показывает влияние D, L-допа на реакцию фенолазы в зависимости от концентрации допа. Как из фиг. 10, так и из фиг.11 моно отчетливо видеть влияние названных диолов

на стадию покоя.

Самоокисление 3,4-диоксифенилаланина, которое наступает при щелочных величинах pH, можно не наблюдать или наблюдать лишь немного при pH 6,5.

Вышеприведенные опыты показывают, что сокращение начальной фазы реакции фенолазы можно вызывать только добавкой диолов. Хинолины и аскорбиновая кислота не оказывают никакого влияния. Поэтому следует полагать, что экстракты *Corydalis* и *Eschscholtzia* содержат орто-диолы, которые вызывают немедленное превращение тирозина до 3,4-диоксифенилаланина. Далее, следует предполагать, что экстракты *Corydalis* и *Eschscholtzia* и на живом организме приводят к более быстрому превращению тирозина и тем самым к более повышенной концентрации "Допа" 3,4-диоксифенилаланина.

2. Исследование реакции допамин- β -гидроксилазы:

Фермент допамин- β -гидроксилазы катализируют превращение допамина до норадреналина. Допамин- β -гидроксилаза также представляет содержащий медь фермент. Гидроксилирование происходит при расходе кислорода и требует аскорбиновой кислоты и фумарата в качестве восстанавливающих агентов, чтобы регенерировать окислительный статус атома меди.

Активность фермента определяют потенциометром на основании расхода молекулярного кислорода. Соответствующая тест-добавка содержала следующие компоненты:

По 100 мл тирамина, фумарата, аскорбата (соответственно 5 ммол),

1 мл фосфатного буферного раствора, pH 5 (100 ммол),

1 мл воды,

100 μ л фермента (соответственно 0,1 единицы).

Нормы расхода кислорода вычисляли на основании O_2 -содержания раствора с температурой 37°C при соответствующем объеме.

При добавке *Eschscholtzia*-экстракта происходит заметное, зависящее от концентрации торможения ферментативной реакции, т.е. гидроксилирование боковой цепи в значительной степени подавляется. Наблюдали, что ферментативная активность тормозится также этанолом. Однако торможение экстрактом значительно выше, так что здесь можно видеть определенное различие.

Фиг. 12 показывает торможение допамин- β -гидроксилазы *Eschscholtzia*-экстрактом (кривая A) и водным 1%-ным раствором подвергнутых сублимационной сушке экстрактов *Eschscholtzia* и *Corydalis* в отношении 20:1 (кривая B) по изобретению.

На фиг. 12 обе кривые показывают отчетливое торможение ферментативной активности. Различия в ходе кривых следовало бы отнести к присутствию или к отсутствию этанола и *Corydalis*-экстракта (кривая B). Снижающееся действие ферментативного торможения при *Eschscholtzia*-экстракте частично можно объяснять расходом кислорода различными субстратами экстракта. Хотя водный раствор

подвергнутых сублимационной сушке экстрактов *Corydalis* и *Eschscholtzia* также показывают расход кислорода с тирамином, аскорбатом и фумаратом; однако тормозящее действие на фермент не снижается, вследствие чего здесь значительно затруднена интерпретация эффекта.

Вышеприведенные опыты ясно показывают, что фермент допамин- β -гидроксилазы тормозят спиртовым экстрактом *Eschscholtzia* (кривая A) и также водным раствором подвергнутых сублимационной сушке *Eschscholtzia* и *Corydalis* (кривая B), что при обмене пирокатехинамина приводит к уменьшению образования норадреналина и адреналина. Это тормозящее действие объясняется успокаивающее действие лекарственного средства по изобретению. Поддерживаемая торможением высокая концентрация допамина вызывает положительное влияние в случае паркинсонизма, картины болезни, при которой допаминэргические нервные клетки разрушены и содержание допамина в головном мозге следует поддерживать высоким искусственными приемами.

3. Исследование реакции моноаминоксидазы (MAO)

Как видно из фиг.1, концентрацию Допа (3,4-диоксифенилаланина) или допамина регулируют также путем его расщепления моноаминоксидазой. Моноаминоксидазы превращают первичные амины при помощи кислорода в водной среде до соответствующего альдегида, аммиака и до соответствующей перекиси водорода в стехиометрическом отношении. Примененная здесь аминоксидаза была куплена у фирмы Сигма Кемикалс. Эта аминоксидаза показывает высокое сродство к бензиламину в качестве субстрата. Поэтому были проведены нижеследующие исследования с бензиламином в качестве субстрата и было проверено влияние *Corydalis* и *Eschscholtzia* на активность этой моноаминоксидазы.

Превращение бензиламина до бензиальдегида благодаря моноаминоксидазе определяли фотометром и потенциометром:

а) При помощи фотометра обнаруживают образующий бензальдегид, который при 241 нм имеет высокий молекулярный удельный показатель поглощения ($1,2 \times 10^4$). Это чувствительное обнаружение позволяет применять очень маленькие количества фермента, которые могут находиться при 0,01 и 0,02 единицы моноаминоксидазы (MAC) в реакционном объеме 2 мл.

Соответствующая тест-добавка с общим объемом 2000 мл содержала:

50 μ л 100 ммол водного раствора бензиламина-HCl (соответственно 2,5 ммол),

100 ммол фосфатного буферного раствора, pH 7,4,

0,01 единицы или 0,02 единицы MAO, добавленной частями по 100 μ л в соответствующий основной раствор;

эталонная кювета содержала буферный раствор, воду и бензиламин.

В опытах с вышеописанной тест-добавкой через 10 мин реакционного времени в измерительную кювету и в эталонную кювету добавляли разбавленные экстракты *Eschscholtzia* и *Corydalis* и определяли измененную активность. Фиг.13 показывает

торможение образования бензальдегида в зависимости от концентрации *Corydalis* (20 или 40 $\mu\text{л}$ 1:10 разбавленного раствора основного экстракта).

На фиг.14 показано торможение экстракта из *Eschscholtzia* на MAO-активность при различных количествах экстракта. При этом наблюдается отчетливое торможение MAO-активности.

Фиг. 15 показывает тормозящее действие MAO-активности в результате добавки различных концентраций *Eschscholtzia*-экстракта (кривая А), *Corydalis*-экстракта (кривая В) и смеси экстрактов *Corydalis* и *Eschscholtzia* в отношении 20:80 (кривая С). Для лучшего сравнения результатов опытов на фиг. 15 дана схема тормозящих действий. При этом активность MAO в каждом опыте была принята за 100% (на основании вязкого раствора сульфата аммония-фермента было трудно брать постоянные количества фермента предложенного в продаже продукта).

Оценка опытов показывает, что экстрактом *Corydalis* вызывает умеренное торможение MAO-активности. Более сильное влияние можно наблюдать благодаря *Eschscholtzia*-экстракту. Значительным является также MAO-торможение в присутствии смеси обоих экстрактов, состоящей из 80% *Eschscholtzia*-экстракта и 20% *Corydalis*-экстракта.

б) При помощи потенциометра можно определить реакцию

$$\text{тиробальдегид} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{бензальдегида} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$$

благодаря уменьшению содержания кислорода в реакционном растворе посредством платиново-кислородного электрода. Доказательство превращения кислорода требует более высоких количеств субстрата и фермента. Соответствующая тест-добавка содержала:

200 $\mu\text{л}$ 100 ммольного раствора бензиламина (соответственно 10 ммол),
1.000 $\mu\text{л}$ 200 ммольного фосфатного буферного раствора, pH 7,5 (соответственно 100 ммол),
1.000 $\mu\text{л}$ дистиллированной воды,
0,05 единицы MAO.

Добавкой 100 $\mu\text{л}$ экстрактов *Corydalis* и *Eschscholtzia* после 3 мин реакционного времени можно вычислить различные нормы превращения кислорода.

Результаты на кислородном электроде показывают уменьшение активности моноаминоксидазы благодаря отдельным экстрактам из *Corydalis* и *Eschscholtzia*. При этом было подтверждено сильное влияние экстракта *Eschscholtzia* на MAO-активность.

Вышеприведенные опыты показывают, что можно достигнуть значительного торможения MAO экстрактами из *Corydalis* и *Eschscholtzia* и смесью этих двух экстрактов. Отсюда можно сделать вывод, что если тормозить активность аминooksидаз в плазме, то амины, как допамин, имеют более длительное время пребывания в токе крови и тем самым дольше остаются эффективными. Отсюда вытекает положительный эффект лекарственного средства согласно изобретению при смягчении состояний возбуждения и дисфункций нервов и получающихся в

результате этого состояния депрессии, особенно также при синдромах дефицита допамина, как паркинсонизм.

Пример 1.

Получение экстракта.

Были получены отдельные экстракты *Corydalis cavae rhizoma* и *Eschscholtzia californicae herba*. Получение отдельных экстрактов осуществляли экстракцией при помощи перколяции при 50 °C в течение 16 ч. Соблюдали отношение высушенных лекарственных растений экстракта 2,5:10, т.е. из 2,5 г соответствующего высушенного лекарственного растения получали 10 мл экстракта высушенного лекарственного растения. Экстрагирующий агент: 30 об. этанол.

Полученные таким путем экстракты можно непосредственно применять для получения состава лекарственного средства, или можно переводить их лиофилизацией в сухой экстракт.

Пример 2.

Влияние DL-дигидроксифенилаланина на реакцию фенолазы (табл.1).

Как показывает фиг.11, DL-допа можно заметно сокращать стадию покоя фенолазы, причем 5 $\mu\text{мол}$ допа вызывают немедленное образование допахрома. С 50 $\mu\text{мол}$ допа реакция непосредственно после начала, вызванного ферментом уже протекает с максимальной нормой превращения.

Самоокисление допа, т.е. образование допахрома без участия фермента, при pH 6,5 в наблюдаемом интервале времени не было установлено.

Однако DL-допа представляет не любой диол, а субстрат фенолазы, продукт которого снова дает допахром. Поэтому ниже были предприняты (пример 3) сравнительные исследования с 3,4-дигидроксibenзолом.

Пример 3.

Влияние 3,4-дигидроксibenзола (как стартера) на реакцию фенолазы (табл. 2).

Оказывается, что орто-дигидроксibenзол при концентрациях 5 и 50 $\mu\text{мол}$ может сокращать или снимать стадию покоя реакции фенолазы (фиг.10).

Пример 4.

а) Определение константы Михаэлиса для превращения тирозина благодаря фенолоксидазе

Условия реакции: фосфатный буферный раствор, pH 6,5, 100 ммол, тирозин 20 $\mu\text{мол}$ до 2 ммол, фенолаза 20 единиц/исходная смесь (табл.3).

Результаты представлены на фиг.6-9.

б) Константа Михаэлиса реакции с экстрактом *Corydalis*.

Исследование нормы превращения в присутствии экстракта *Corydalis* проводится с разбавлением экстракта 1:200. Это количество экстракта приводило в предшествующих опытах к немедленному наступлению полной ферментативной активности, начальная фаза составляет 0 мин.

Определенные K_m -величины показывают в присутствии *Corydalis*-экстракта несколько повышенный разброс, однако лежат в одинаковой области концентраций.

Константы Михаэлиса в присутствии экстракта *Corydalis* (табл.4).

Результаты представлены на фиг.4 и 5.

Пример 5.

а) Влияние экстракта *Corydalis*:

Как показывает табл.5 и фиг.13, экстракт из *Corydalis cava* тормозит активность МАО. При этом применяют 20 или 40 μ л 1:10 разбавленного раствора экстракта (2 или 2 μ л основного вещества). Эти количества соответствуют, в пересчете на общий объем реакции 2 мл, разбавлению 1:1000 или 1:500. Собственная абсорбция экстракта при 241 нм благодаря присутствию многочисленных ароматических соединений препятствует исследованию более крупных количеств экстракта, так как в этом случае невозможно больше уравнивание реакционной и эталонной кюветы.

Активность МАО [мЕ/мин] под влиянием *Corydalis*

Результаты представлены на фиг.4

б) Влияние экстракта *Eschscholtzia*:

На основании повышенной прозрачности экстракта *Eschscholtzia* в этом исследовании можно применять 20, 40 и 60 μ л 1:10 разбавленного раствора. В этом случае в реакционной исходной смеси находится 1:1000, 1:500 и 1:330 разбавленный раствор экстракта *Eschscholtzia*.

Табл.6 и фиг.14 поясняют высокую тормозящую способность этого экстракта: уже с разбавлением 1: 500 поддерживают активность моноаминоксидазы четко ниже 50% с разбавлением 1:330 активность фермента снижается до трети первоначальной величины.

Активность МАО под влиянием *Eschscholtzia*

Результаты представлены в табл.14.

Пример 6.

Получение фармацевтической лекарственной формы.

а) Получение настойки.

Для получения настойки смешивали изготовленные по примеру 1 спиртовые экстракты высушенных лекарственных растений, а именно 20 мл экстракта высушенного лекарственного растения *Corydalis cavae rhizoma* и 80 мл экстракта высушенного лекарственного растения *Eschscholtzia californicae herba*. Получают 10 мл готовой к употреблению настойки.

б) Получение таблеток.

Полученные по примеру 1 экстракты из

Corydalis cavae rhizoma и *Eschscholtzia californicae herba* сушили (например лиофилизацией), и сухие экстракты перемешивали в весовом отношении *Eschscholtzia/Corydalis* 4/1 вместе с измельченным в порошок крахмалом (в качестве фармацевтического вещества-носителя) и формовали на таблетировочном прессе в таблетки (0,5 г, диаметр 0,6 см). Количество экстрактов активного вещества в таблетках составляло 2 мас.

Формула изобретения:

1. Растительный экстракт, обладающий допаминергической активностью, отличающийся тем, что он получен раздельной экстракцией спиртом (2,5 10) *Corydalis* и *Eschscholtzia* с последующим смешением экстрактов при массовом соотношении сухих веществ экстракта *Corydalis* и экстракта *Eschscholtzia* 1: 1-20.

2. Экстракт по п. 1, отличающийся тем, что объемное соотношение спиртовых экстрактов *Corydalis* и *Eschscholtzia* составляет 1:2-10.

3. Экстракт по п. 1, отличающийся тем, что объемное соотношение спиртовых экстрактов *Corydalis* и *Eschscholtzia* составляет 1:4.

4. Экстракт по пп. 1 3, отличающийся тем, что он представляет собой смесь экстрактов *Corydalis cavae rhizoma* и *Eschscholtzia californicae herba*.

5. Экстракт по пп. 1 4, отличающийся тем, что он представляет собой порошок.

6. Экстракт по пп. 1 5, отличающийся тем, что он дополнительно содержит фармацевтически приемлемые целевые добавки.

7. Экстракт по пп. 1 6, отличающийся тем, что он представляет собой форму для орального введения.

8. Экстракт по пп. 1 4, 6, 7, отличающийся тем, что он представляет собой настойку.

9. Экстракт по пп. 1, 6 7, отличающийся тем, что он представляет собой таблетку, драже или капсулу.

10. Экстракт по пп. 1 9, отличающийся тем, что он получен из высушенных растений.

Т а б л и ц а 1

Условия реакции: фосфатный буферный раствор, pH = 6,5, 100 ммол, тирозин 2 ммол, фенолаза 20 единиц, DL – дигидроксифенилаланин, изменяемое количество

Фенолаза			+ ДОПА 500 нмол		+ ДОПА 5 ммол		+ ДОПА 50 ммол	
τ (мин)	мЕ	+/-	мЕ	+/-	мЕ	+/-	мЕ	+/-
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2			4	0	23	2,2	70	4,5
4			13	1,5	69	2,9	157	8,1
6	5	0,53	28	3,2	117	5,2	236	11
8	6	1,2	50	2,9	170	4,7	321	15
10	12	1,5	75	5,1	223	7,2	402	15
12	23	2,2	..	..	..	..	..	..
14	39	3,1						
16	60	4,7						
18	84	7,3						
20	139	16	291	14	554	16	775	29
..	..	..	..	..	..	..	..	..
30	404	32	562	28	883	21	1090	37

Т а б л и ц а 2

Условия реакции: фосфатный буферный раствор, pH = 6,5, 100 ммол, тирозин 2 ммол, фенолаза 20 единиц, 3,4 – дигидроксibenзол, изменяемое количество

Фенолаза			+ 3,4-DHB 5 μмол		+ 3,4-DHB 5 μмол	
τ (мин)	мЕ	+/-	мЕ	+/-	мЕ	+/-
0	0	0	0	0	0	0
2			6	1,7	27	2,7
4			15	1,3	63	4,8
6	8	0,91	33	4,1	102	8,9
8	16	1,3	58	6,2	143	13
10	38	2,7	97	11	180	18
..	..	..	..	..	..	..
20	312	14	355	42	446	42
..	..	..	..	..	..	..
30	678	29	638	64	712	69

Таблица 3

Условия реакции: фосфатный буферный раствор, pH = 6,5, 100 ммол, тирозин 20 μ мол до 2 ммол, фенолаза 20 единиц /исходная смесь

Концентрация субстрата	Обратная концентрация, л/(М)	Обратная норма превращения 1/(мЕ/мин)
Область от 20 μ мол до 1 ммол		
20 μ мол	0,05	0,27
40 μ мол	0,025	0,173
60 μ мол	0,0167	0,0116
80 μ мол	0,0125	0,098
100 μ мол	0,01	0,076
500 μ мол	0,002	0,044
1 ммол	0,001	0,040
К _М = 141 μ мол		
Область от 20 до 70 μ мол		
20 μ мол	0,05	0,163
30 μ мол	0,033	0,125
40 μ мол	0,025	0,100
50 μ мол	0,020	0,081
70 μ мол	0,014	0,061
К _М = 145 μ мол		
Область от 100 до 200 μ мол		
100 μ мол	0,01	0,0555
120 μ мол	0,0083	0,0525
140 μ мол	0,0071	0,0475
160 μ мол	0,0063	0,0435
180 μ мол	0,0056	0,0415
200 μ мол	0,005	0,040
К _М = 142 μ мол		
Область от 1 до 2 ммол		
1000 μ мол	0,001	0,03352
1400 μ мол	0,00071	0,0340
1800 μ мол	0,00055	0,0334
2000 μ мол	0,0005	0,0330
К _М = 137 μ мол		

Т а б л и ц а 4

Условия реакции: фосфатный буферный раствор, pH = 6,5, 100 ммол, тирозин от 20 μ мол до 2 ммол, фенолаза 20 единиц/исходная смесь, экстракт *Corydalis* 1:2000

Концентрация субстрата	Обратная концентрация, 1/(М)	Обратная концентрация, 1/(мЕ/мин)
Область от 20 до 100 μ мол		
20 μ мол	0,05	0,083 0,262
30 μ мол	0,033	0,057
40 μ мол	0,025	0,045
50 μ мол	0,020	0,040
60 μ мол	0,017	0,033 0,110
70 μ мол	0,014	0,030
100 μ мол		0,080
$K_M =$	164 μ мол	137 μ мол
Область от 100 до 200 μ мол		
100 μ мол	0,01	0,0500
120 μ мол	0,0083	0,0435
140 μ мол	0,0071	0,0414
160 μ мол	0,0063	0,0383
180 μ мол	0,0056	0,0370
200 μ мол	0,005	0,0344
$K_M =$		151 μ мол

Т а б л и ц а 5

Условия реакции: фосфатный буферный раствор, pH = 7,4, 100 ммол, бензиламин 2,5 ммол, моноаминооксидаза 0,01, 0,02 единиц/исходная смесь, экстракт *Corydalis* 1:10, изменяемое количество

бензальдегид (мЕ/мин)		
	0,01 единицы MAO;	0,02 единицы MAO;
+ 2 μ л COR	8,35 $\pm$ 0,50 (100%)	18,4 $\pm$ 1,00 (100%)
+ 4 μ л COR	6,30 $\pm$ 0,02 (75,4%)	12,6 $\pm$ 1,00 (68,5%)
	5,50 $\pm$ 0,00 (65,9%)	12,2 $\pm$ 0,45 (66,3%)

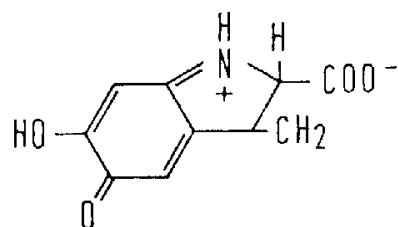
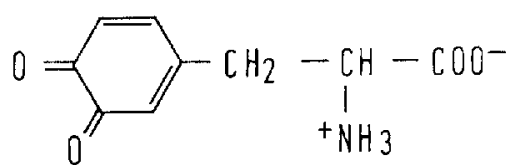
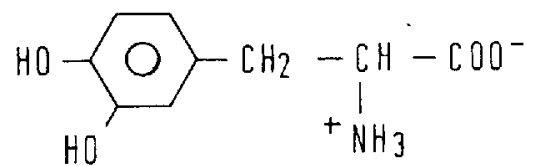
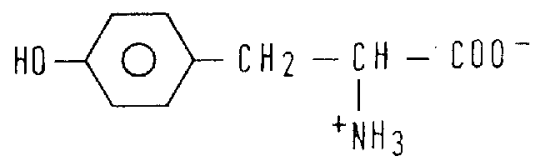
Т а б л и ц а 6

Условия реакции: фосфатный буферный раствор, pH = 7,4, 100 ммол, бензиламин 2,5 ммол, моноаминооксидаза 0,01, 0,02 единицы/исходная смесь, экстракт *Eschscholtzia* 1:10, изменяется

бензальдегид (мЕ/мин)		
	MAO 0,01 единицы	MAO 0,02 единицы
+ 2 μ л ESCH	10,3+/- 1,40 (100%)	20,0+/- 0,30 (100%)
4 μ л	5,75 /0,25 (55,5%)	11,3/0,55 (55%)
5 μ л	4,50/0,00 (43,7%)	8,50/0,30 (42,5%)
	3,50/0,00 (33,9%)	7,50/0,30 (37,5%)

RU 2072859 C1

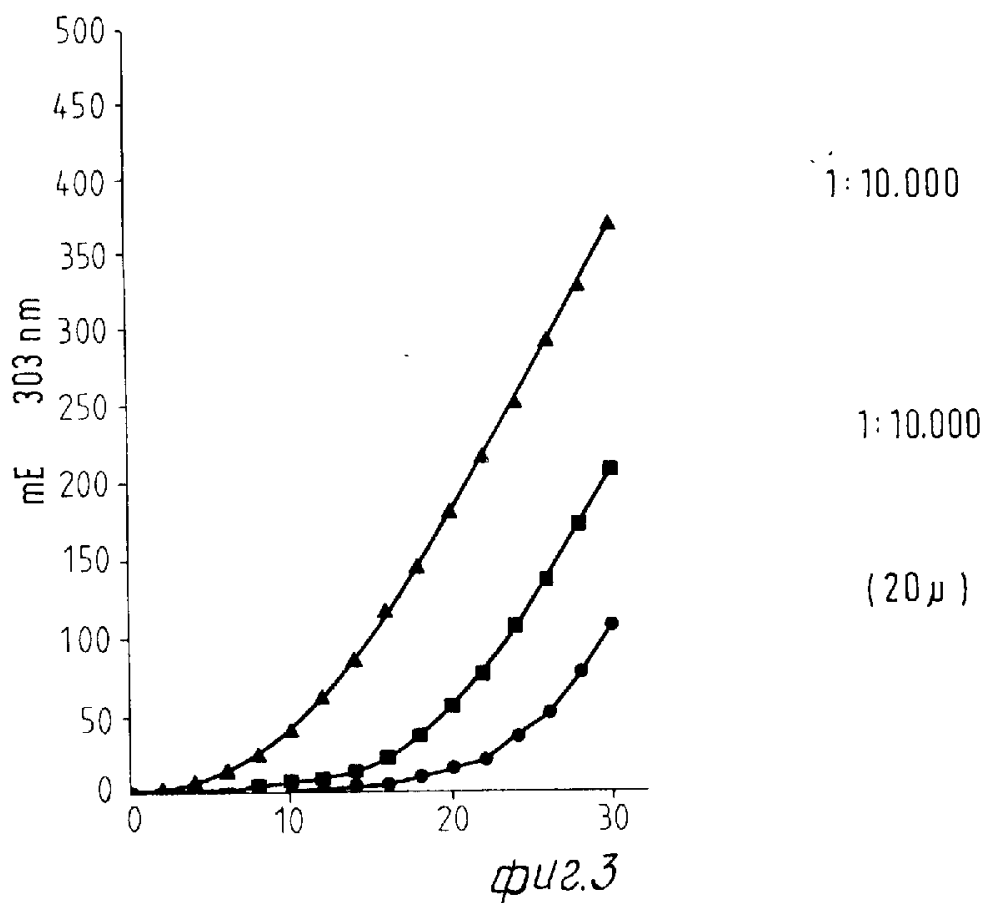
RU 2072859 C1



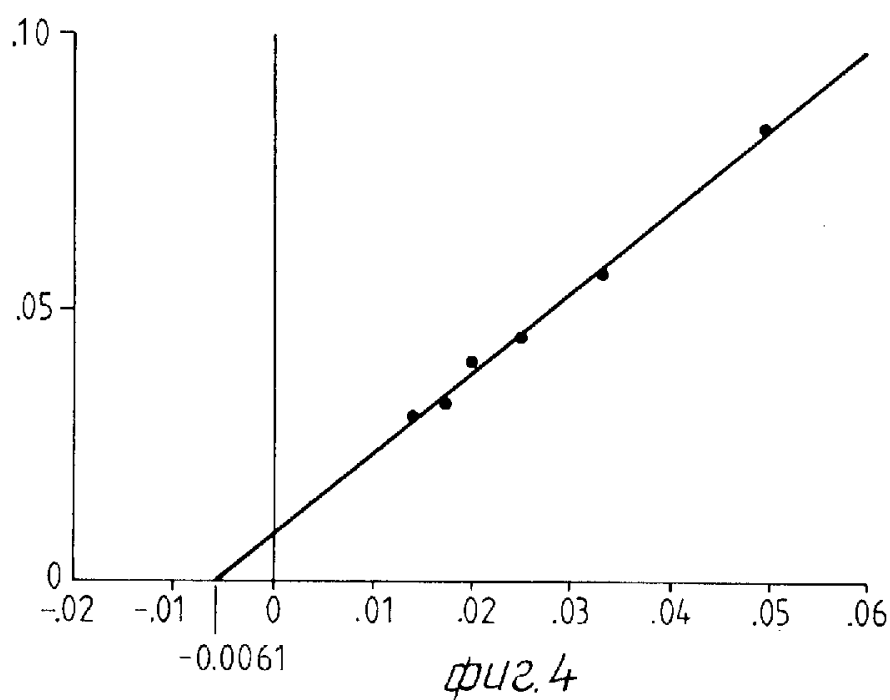
фиг.2

RU 2072859 C1

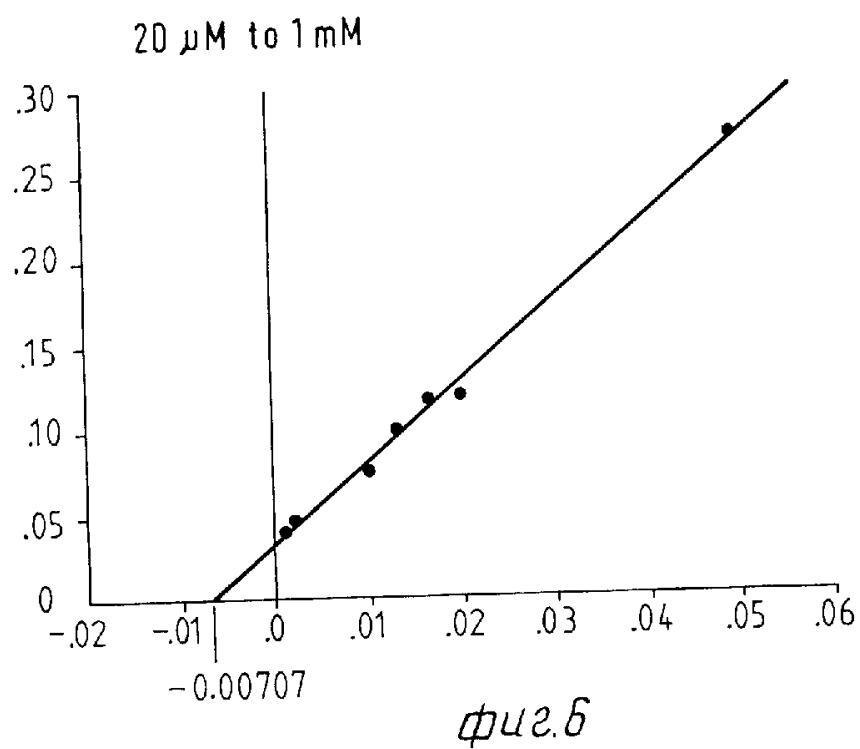
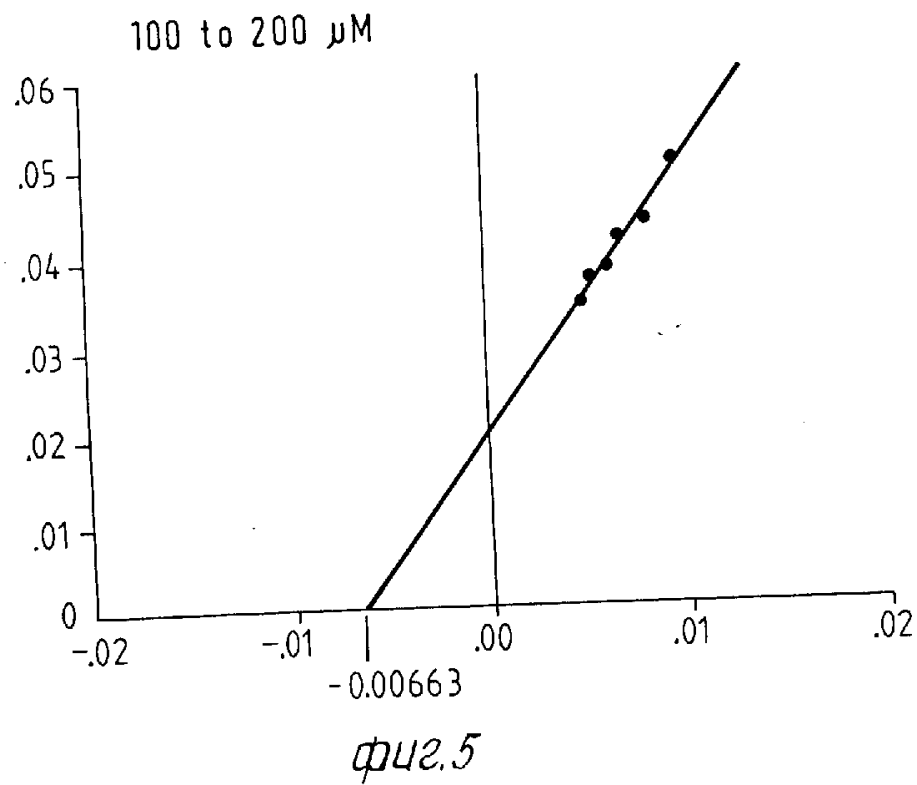
RU 2072859 C1



20 to 100 μ M

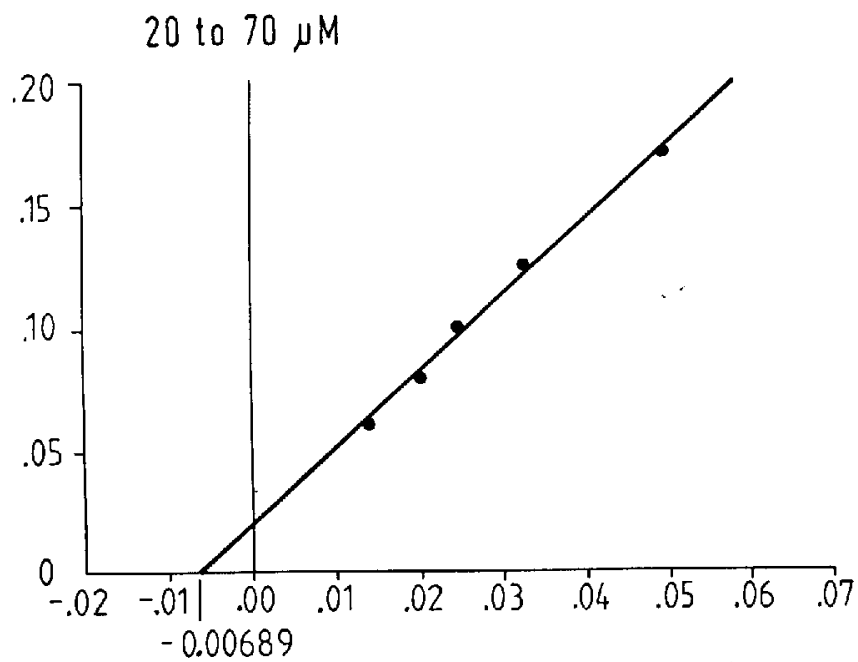


RU 2072859 C1

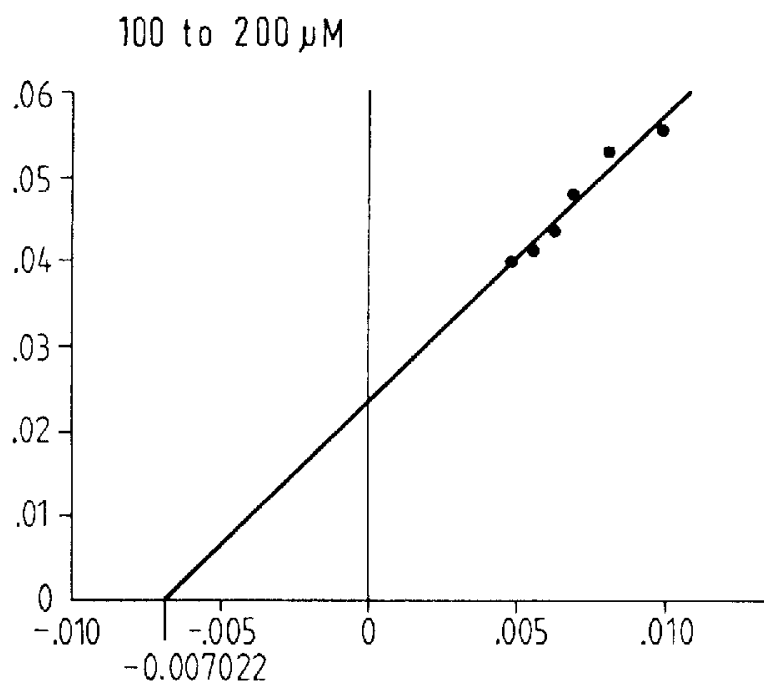


RU 2072859 C1

RU 2072859 C1



$\phi_{u2.7}$

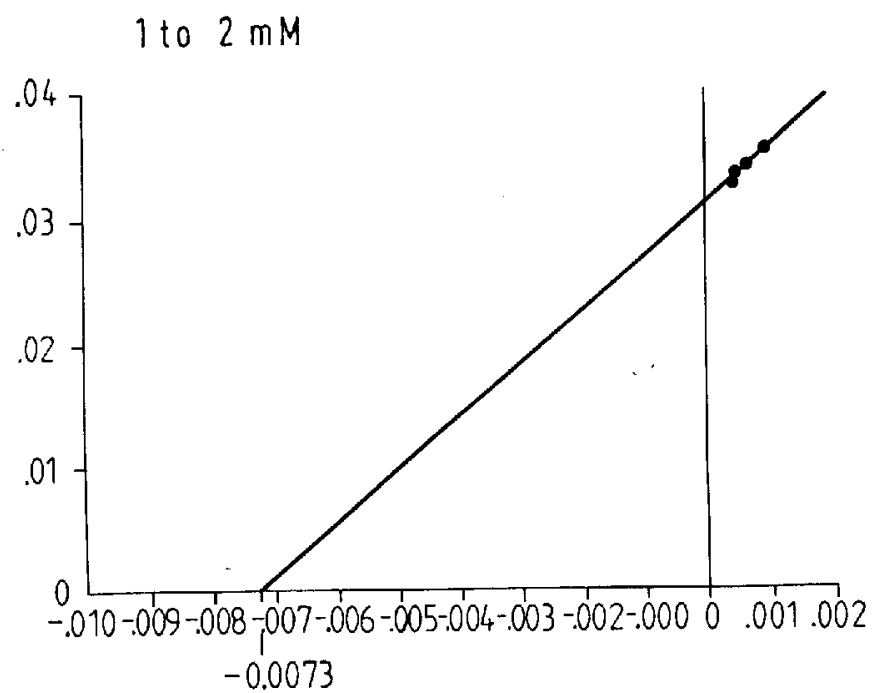


$\phi_{u2.8}$

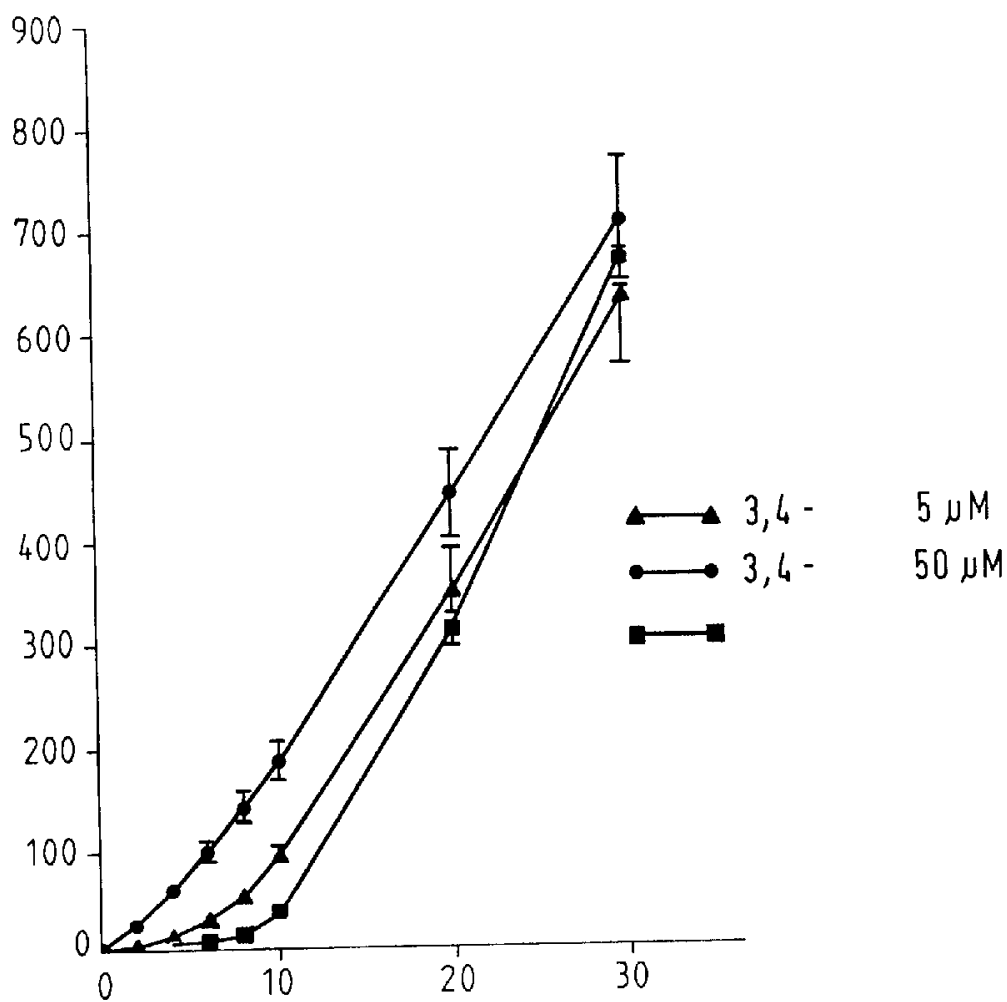
RU 2072859 C1

RU 2072859 C1

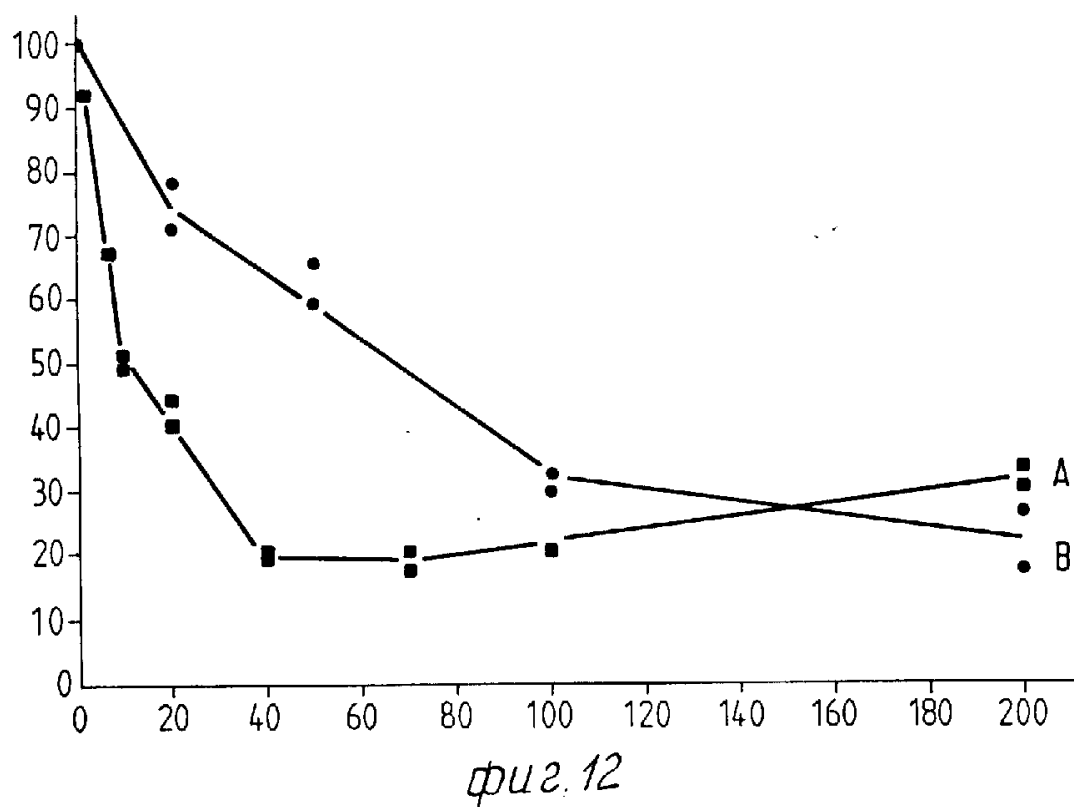
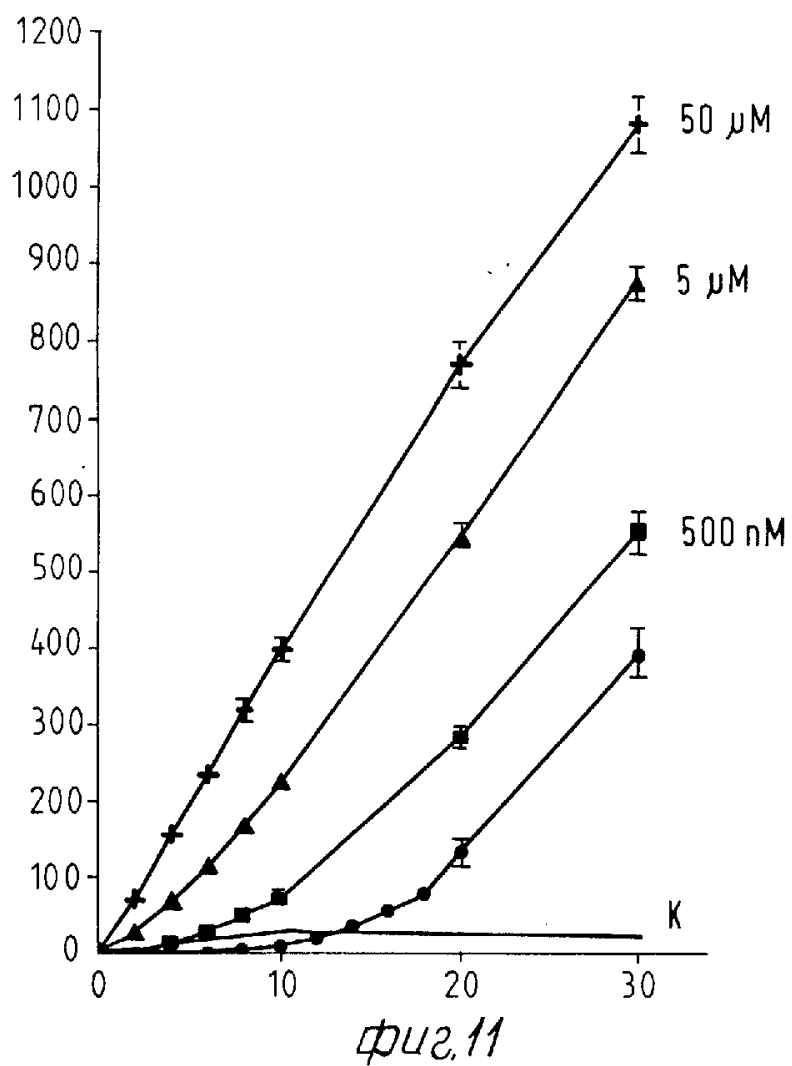
RU 2072859 C1



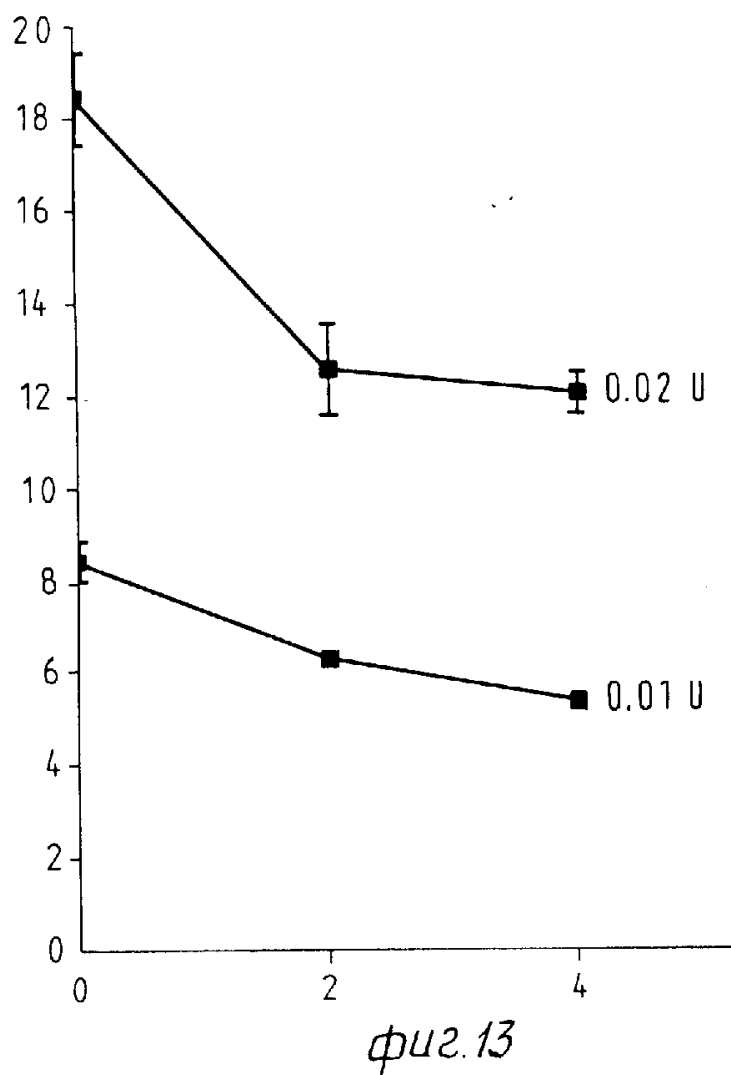
фиг. 9



фиг. 10

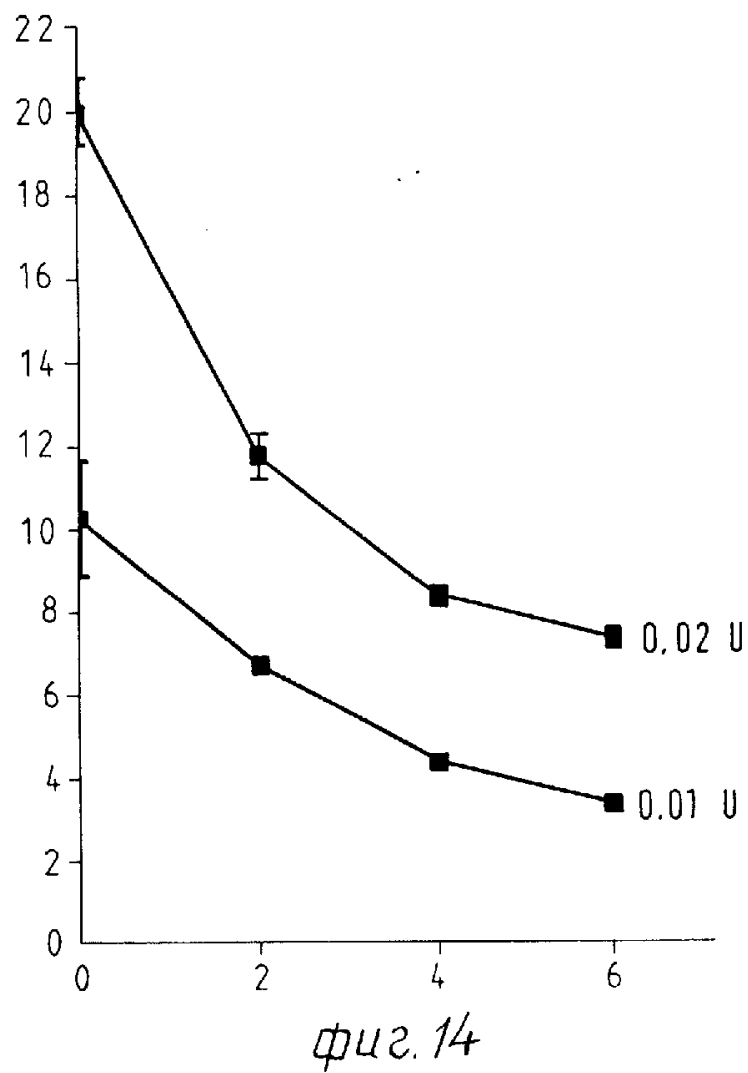


RU 2072859 C1



RU 2072859 C1

RU 2072859 C1



RU 2072859 C1

