



Patent dodatkowy  
do patentu nr ———

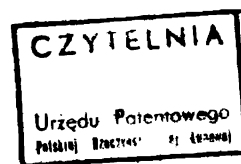
Zgłoszono: 83 03 03 (P. 240853)

Pierwszeństwo: 82 03 04 dla zastrz. 1–2  
83 02 09 dla zastrz. 3  
Węgry

Zgłoszenie ogłoszono: 86 02 11

Opis patentowy opublikowano: 89 01 31

Int. Cl.<sup>4</sup> A61K 31/715  
A61K 35/78



**Twórcy wynalazku:** Kálmán Szendrei, Emil Minker, Zsuzsanna Rózsa,  
Lehel Koch, Lajos Wolf

**Uprawniony z patentu:** Központi Váltó-és Hitelbank Rt.,  
Innovációs Alp,  
Budapeszt (Węgry)

## **Sposób wytwarzania biologicznie czynnych koncentratów polisacharydów**

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania biologicznie czynnych koncentratów polisacharydów. Koncentraty polisacharydów wytwarza się z surowców roślinnych. Mają one działanie lecznicze, zwłaszcza przeciwzapalne i stosowane są do wytwarzania preparatów farmaceutycznych i leczniczo-kosmetycznych.

Pod pojęciem polisacharydów rozumie się tu optycznie czynne heteropolisacharydy, które zbudowane są z monosacharydów o budowie furanozowej lub piranozowej o wiązaniu eterowym lub glikozydowym i których kwasowe lub zasadowe grupy funkcyjne mogą być ewentualnie sprzężone z białkiem i/lub peptydami (peptydoglikany albo glikoproteiny).

Pod pojęciem działania przeciwzapalnego rozumie się tu wszystkie działania, które mogą być objęte próbą obrzęku wywołanego karageniną na łapie szczura, względnie nie mogą być wykluczone. Czynnymi substancjami przeciwzapalnymi w próbie obrzęku na łapie szczura mogą być środki przeciwreumatyczne, środki przeciw wrzodom, odpowiednie do stosowania zewnętrznego maści, żele lub roztwory, a pojedynczo także lecznicze kosmetyki.

Stosowane obecnie w lecnictwie czynne substancje przeciwzapalne nienaturalnego pochodzenia zawierają albo steroidy, co stwarza liczne problemy tolerancji, na przykład wykazują one często działanie hormonalne, powiększają zatrzymywanie sodu w organizmie albo powodują zanik. Niesteroidowe substancje przeciwzapalne wykazują działanie uboczne, które ograniczają ich zastosowanie. Indometacyna i salicylany mają na przykład działanie uboczne, a mianowicie osłabiają odporność organizmu, atakują przewód pokarmowy, powodują krwotoki wewnętrzne i wrzody żołądka. Ze względu na toksyczne działanie uboczne czyniono coraz większe starania, aby wynaleźć naturalne substancje przeciwzapalne. Tego rodzaju badania prowadzone są intensywnie, jako że ostatnio środki przeciwzapalne znajdują większy zakres stosowania. Można je stosować także do leczenia zaburzeń zaopatrzenia tkanek w tlen, na przykład zawału serca, innych uszkodzeń tkanki przez zaburzenie krążenia oraz do leczenia stanów wstrząsu.

W dziedzinach, w których wymagane są substancje przeciwzapalne, stosuje się w lecnictwie i w kosmetyce w podobny sposób liczne rośliny lecznicze i wytworzone z nich preparaty. Te składniki

surowców roślinnych i uzyskanych z nich preparatów, które odpowiedzialne są za działanie, są po większej części jeszcze nieznane. Kwiat rumianku (*Chamomillae flos*) stosuje się szeroko do leczenia najróżniejszych schorzeń w postaci herbaty, mieszanej herbaty, ekstraktów wodnych lub zawierających rozpuszczalniki lub destylatów (eteryczny olejek). Do przypuszczalnych i częściowo udowodnionych farmakologicznych działań surowców roślinnych należą działania przeciwzapalne oraz działanie wywierane na mięsień sercowy, (A. Auster, J. Schäfer: *Arzneipflanzen* 15. 19. 21.; *Lieferungen*; W. Spaich: *Moderne Phytotherapie*, Haug Verlag 1978). Kwiat rumianku stosuje się w pierwszym rzędzie w lecznictwie, jak też w kosmetyce do leczenia stanów zapalnych na skórze i błonach śluzowych, a mianowicie w postaci maści, kąpieeli, inhalacji, pędzlowań, herbat, ewentualnie z wodnymi wyciągami albo z substancją czynną włączoną do środka kosmetycznego. Wewnętrznie rumianek stosuje się najczęściej w postaci herbaty przy nieżytach i skurczach układu trawienego, przy wrzodowych schorzeniach błon śluzowych albo ich uszkodzeniach. Według nowszych badań przeciwzapalne działanie rumianku tłumaczone jest terpenoidami o charakterze lipidów (kamazulen,  $\alpha$ -bisabolol, tlenki bisabolola) (O. Isaak: *Planta Med.* 35, 118 (1979). Przez pomiar działania przeciwzapalnego nośników działania można było ustalić, że ich wartości  $ED_{50}$  leżą przy dawce 1465–3164 mg/kg. Pomiedzy rzeczywistym stężeniem substancji czynnej w surowcu roślinnym i preparacie z jednej strony i działaniem leczniczym przypisanym substancjom czynnym istnieje widoczna różnica (Verzárné Petri G.; Marczal J.: *Herba Hung.* 15 (2) 69, (1976).

Jeżeli dowiedzione jako nośniki działania związki typu lipidów źle rozpuszczają się w wodzie, powstaje pytanie: dlaczego one mogą być najważniejszymi składnikami herbat i preparatów przygotowanych z wodą? Jest wiele gatunków roślin stosowanych jako rośliny lecznicze albo nie traktowanych jako rośliny lecznicze, z których nie można było uzyskać składników o działaniu przeciwzapalnym. Należą do nich na przykład gatunki *Tilia*, *Malva*, *Plantago*, *Linum usitatissimum*, *Trigonella foenum-graecum* i *Cydonia oblongara*.

Z brytyjskiego opisu patentowego nr 2 008 408 znany jest środek do zmniejszania zgagi spowodowanej zawracaniem soków żołądkowych, składający się z wodnego roztworu śluzu, roślinnych polisacharydów, na przykład śluzu roślinnego nasion pigwy, w którym chodzi o nadającą się do pica substancję, która stanowi ciecz przy wartości pH wyższej od pH zawartości żołądka, a która przy wartości pH odpowiadającej zawartości żołądka ludzkiego tworzy żel, oraz z dopuszczalnej fizjologicznie cieczy o niewielkiej gęstości, takiej jak olej roślinny, która obniża ciężar właściwy środka poniżej ciężaru właściwego zawartości żołądka, tak że wytworzony w żołądku żel pływa na powierzchni zawartości żołądka. Wytwarzanie tego środka polega na ekstrahowaniu śluzu z nasion za pomocą gorącej wody i oddzieleniu wodnego śluzu od pozostałości nasion. Przy czym wszystkie polisacharydy przechodzą do śluzu roślinnego, tak że większa część zawartych w nim polisacharydów ma tylko niewielki ciężar cząsteczkowy leżący poniżej 75 000, podczas gdy im mniejszy jest ciężar cząsteczkowy, tym lepsza jest rozpuszczalność w wodzie.

Z opisu patentowego RFN nr 876 305 jest znany sposób wytwarzania tarapeutycznie czynnych preparatów roślinnych, które obok rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie substancji czynnych zawierają też olejki eteryczne i substancje zapachowe, w którym surowce roślinne po uprzedniej obróbce mechanicznej, przy zastosowaniu dodatkowych saponin, środków sieciujących i emulgujących lub podobnie działających substancji, doprowadza się do postaci hemogenicznego, koloidalnego roztworu lub emulsji i następnie oddziela całkowicie lub w większej części nierozpuszczalne substancje stałe roślin na przykład za pomocą zespołu filtrów. Opisane jest tam też działanie przeciwzapalne tak otrzymanych produktów. Na skutek zastosowania saponin, środków sieciujących i emulgujących lub substancji działających podobnie do wyciągu przechodzą jednak także substancje nierozpuszczalne w wodzie i niskociężarkowe polisacharydy o ciężarze cząsteczkowym poniżej 75 000, jak też olejki eteryczne i substancje zapachowe o niskim ciężarze cząsteczkowym wynoszącym około 700–800. Ponieważ nie jest przewidziane strącanie frakcji, pozostają one w wyciągu. Ma to ten skutek, że produkty otrzymane tym sposobem mają tylko niewielkie działanie przeciwzapalne o wartości  $ED_{50}$  wynoszącej 1500 do 3000 mg/kg.

Z francuskiego opisu patentowego nr 2426 M, znane są wodne lub wodno-glicerynowe wyciągi z roślin prawoślazu (*Althaea officinalis*) jako środki lecznicze na przykład do leczenia zapaleń. Ponieważ znów nie następuje wytrącanie frakcji, wszystkie polisacharydy przechodzą do

wyciągu tak, że większa część polisacharydów spośród nich posiada niskie ciężary cząsteczkowe poniżej 75 000. Wynika to bezpośrednio z informacji podanej na str. 2, lewa szpalta, wiersze 14, do 15, gdzie jest powiedziane, że produkty ulegają reakcjom charakterystycznym dla cukrów  $C_5$  (nie występuje to jednak po kwasowej hydrolizie), które mają jednak ciężar cząsteczkowy około 150. Dlatego działanie przeciwzapalne tych produktów jest znów tylko niewielkie i wartość  $ED_{50}$  wynosi 1500 do 3000. Poza tym proste wyciągi wodne lub wodno-glicerynowe otrzymywane tym sposobem mają po roku bardzo różnorodne działanie na pożywkę i stan wegetatywny roślin, dlatego też nie były odpowiednie dla praktycznego sporządzania leków.

Z brytyjskiego opisu patentowego nr 878 430 znany jest materiał polisacharydowy, który otrzymuje się z roślin *sasafras*, to znaczy określonego gatunku *Lorbeer*, oraz sposób jego otrzymywania. Według tego sposobu materiał roślinny najpierw ekstrahuje się wodą i wodny wyciąg traktuje się niższym alkoholem alifatycznym takim jak etanol, przy czym stosowany jest osad otrzymany tylko z roztworu o zawartości 45–75% rozpuszczalnika, podczas gdy osad wytrącony uprzednio z roztworu zawierającego tylko do 45% rozpuszczalnika jest odrzucony. W związku z tym odrzucany jest materiał zawierający większą część polisacharydów o wyższym ciężarze cząsteczkowym, podczas gdy materiał zawierający większą część polisacharydów o niskim ciężarze cząsteczkowym odprowadzany jest do stosowania i farmacji. I tak na stronie 1, wiersze 31 do 39 wymienionej publikacji podano, że polisacharydy z tego materiału polisacharydowego mają ciężary cząsteczkowe od 20 000 do 400 000, przy czym średni ciężar cząsteczkowy wynosi około 100 000, oraz zawierają one galaktozę, arabinozę, ramnozę i ksylozę. Zakres ciężarów cząsteczkowych od 20 000 do 400 000 polisacharydów materiału polisacharydowego według wymienionej publikacji wykazuje, że ten materiał polisacharydowy zawiera polisacharydy o ciężarze cząsteczkowym dużo niższym od 50 000. Wynika to też z podanego średniego ciężaru cząsteczkowego, wynoszącego 100 000, ponieważ jak wynika z doświadczenia ciężar cząsteczkowy polisacharydów w roślinach jest rozdzielony zgodnie z krzywą podziału według Gausa tak, że przy średnim ciężarze cząsteczkowym 100 000 jest wykluczone, żeby nie występowały polisacharydy o ciężarze cząsteczkowym poniżej 75 000. Ponadto uzyskuje się, bez uprzedniej hydrolizy kwasowej, galaktozę, arabinozę, ramnozę i ksylazę, które mają ciężary cząsteczkowe około 150. Jako działanie farmakologiczne produktów według opisanej publikacji podaje się tylko działanie przeciwko wirusom i przeciwko lipemii, a nie mówi się nic o działaniu przeciwzapalnym.

W „Chemical and Pharmaceutical Bulletin” tom 25, Nr 6, czerwiec 1977, strony 1357 do 1362, opisane jest wydzielanie i oznaczanie śluzu roślinnego uzyskanego z korzeni *Althaea officinalis* L., przy czym do jego wytwarzania stosuje się ekstrakcję zimną wodą a następnie strącanie etanolem. Jako ciężar cząsteczkowy produktu podano na str. 1358, wiersz 14 od dołu tej publikacji niską wartość wynoszącą tylko 34 000. Na temat działania farmakologicznego produktów nic się nie mówi, a tylko dla korzeni wymienionej rośliny jest podane, że mają one działanie zmiękczające i deemulgujące oraz działanie przeciw kaszlowi.

Z Chemical Abstracts, tom 91, nr 5, 30 lipca 1979, strona 315, nr 35698 q znane są hydrolizaty z materiału roślinnego *Flos chamomillae* zawierające glikozę, fruktozę, arabinozę, ksylozę, ramnozę i kwas galakturonowy. Polisacharydy tego materiału mają jednak niski ciężar cząsteczkowy wynoszący tylko 4350.

Celem wynalazku było wyodrębnienie z roślin już zbadanych albo nie stosowanych jako rośliny lecznicze biologicznie czynnej, a przede wszystkim przeciwzapalnej grupy związków, które po stosunkowo prostej obróbce można uczynić odpowiednimi do wytwarzania środków farmakologicznych i kosmetycznych, i których działanie przeciwzapalne jest porównywalne z działaniem przeciwzapalnym obecnie stosowanych środków, jednak przy znacznie mniejszej toksyczności.

Sposób wytwarzania biologicznie czynnych koncentratów polisacharydów, zwłaszcza o działaniu przeciwzapalnym, o ciężarze cząsteczkowym zawartym pomiędzy 75 000 i 2000 000, z roślin należących do rodzin: dyniowatych (*Cucurbitaceae*), motylkowych (*Papilionaceae*), lipowatych (*Tiliaceae*), wargowych (*Labiatae*), ślazowych (*Malvaceae*), złożonych (*Asteraceae*), baldaszkowych (*Umbelliferae*), rutowatych (*Rutaceae*), komosowatych (*Chenopodiaceae*), inowatych (*Linaceae*), różowatych (*Rosaceae*) i babkowatych (*Plantaginaceae*), a zwłaszcza z kwiatu rumianku (*Chamomillae flos*), kwiatu lipy (*Tiliae flos*), korzenia białego ślazu (*Altheae radix*), liścia i kwiatu

ślazu (*Malvae folium et flos*), ślazu ogrodowego (*Malvae arborease herba*), liścia babki (*Plantaginis folium*), nasion płesznika (*Psyllii semen*), nasion pigwy (*Cydoniae semen*), siemienia lnianego (*Lini semen*), nasion jaskra greckiego (*Trigonella foenigraeci semen*), owocu dyni (*Cucurbita maximae fructus*), ziela Kitaibelle *vitifolia* lub ich mieszaniny poprzez maceryzację wodą i wytrącanie alkoholem, znamienny tym, że suszony lub świeży, ewentualnie potraktowany uprzednio rozpuszczalnikiem ogranicznym, surowiec roślinny maceruje się z wodą w stosunku 1 : 5-20 w ciągu 1-24 godzin, w temperaturze 15-40°C, oddziela się przez wirowanie lub filtrowanie fazę stałą, ewentualnie z części ciekłej w temperaturze 40-80°C oddziela się osad białek, a następnie dodaje się 1 : 3 objętości alkoholu zawierających 1-3 atomów węgla, aceton lub 1-3 wartościowe kationy, wytrącając koncentrat polisacharydów, który oddziela się od fazy wodnej za pomocą wirowania i/lub filtrowania i ewentualnie otrzymany surowy produkt oczyszcza się przez wielokrotne wytrącanie z alkoholu.

Korzystnie świeże rośliny lub nawodnione suszone rośliny miele się lub rozdrabnia, odciska otrzymaną breję, pozostałość po odcisnięciu ponownie traktuje się wodą i ponownie odciska.

Surowy koncentrat polisacharydów rozpuszcza się korzystnie w 30-40 krotnej ilości wody, w temperaturze 50-75°C, roztwór oczyszcza się przez odwirowanie, a następnie filtruje się pod ciśnieniem przez filtr membranowy przepuszczający substancje o ciężarze cząsteczkowym poniżej 75 000, a z roztworu pozostałego po wysokocząsteczkowej stronie filtra wytrąca się alkoholem polisacharydy.

Szczególnie korzystny pod względem działania przeciwzapalnego polisacharyd wytwarzany z dyni (*Cucurbita maximae fructus*) wykazuje następujące cechy:

Ciężar cząsteczkowy powyżej 300 000, zawartość azotu najwyżej 3%, zawartość fosforu (wyrażona jako  $P_2O_5$ ) najwyżej 5%, pozostałość po prażeniu najwyżej 20%, zawartość redukujących cukrów co najmniej 30%, całkowita zawartość cukrów co najmniej 60%, po kwasowej hydrolizie zawiera zasadniczo glukozę, galaktozę i kwas uronowy jako działanie przeciwzapalne w próbie obrzęku wywołanego karageniną na łapie szczura przy dawce 10 mg/kg wynosi co najmniej 50%. Podobnie korzystny jest polisacharyd wytworzony z nasion jaskra greckiego (*trigonella foenigraeci semen*); jego ciężar cząsteczkowy wynosi powyżej 100 000, zawartość azotu najwyżej 3%, zawartość fosforu (wyrażona jako  $P_2O_5$ ) najwyżej 4%, pozostałość po prażeniu najwyżej 5%, zawartość cukrów redukujących co najmniej 50%, całkowita zawartość cukrów co najmniej 70%, po kwasowej hydrolizie zawiera głównie galaktozę i mannozę, działanie przeciwzapalne (dawka 10 mg/kg) w wymienionej próbie obrzęku wynosi co najmniej 40%.

Wytwarzane sposobem według wynalazku koncentraty polisacharydów mogą zawierać ewentualnie znane, niestereoidowe substancje przeciwzapalne, zwłaszcza indometacynę i kwas acetylosalicylowy względnie jego pochodne oraz poza tym zwykłe nośniki i środki ułatwiające preparowanie.

Przeciwzapalne działanie wytworzonych sposobem według wynalazku koncentratów polisacharydów badano według metody C. A. Winter i inni (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 544 /1962) w próbie obrzęku wywołanego karageniną na łapie szczura.

Badania farmakologiczne dowiodły poza tym, że koncentraty polisacharydów względnie ich czynna substancja przeciwzapalna działają przez wpływ na fazę chininową zapalenia. Jak wiadomo, w rozwoju obrzęku wywołanego karageniną rozróżnia się trzy fazy: faza aminowa (histamina, serotonin), faza chininowa (bradykinina) i faza prostaglandynowa (PG). Dla wytworzenia fazy prostaglandynowej, od wstrzyknięcia karageniny wywołującej zapalenie wymagane jest 5 godzin. Koncentraty polisacharydów wytworzone sposobem według wynalazku nie hamują syntezy prostaglandyny, ponieważ nie wykazują one działania wrzodotwórczego. To należy szczególnie podkreślić dlatego, że niesteroidowe środki przeciwzapalne oraz środki przeciwrheumatyczne — które przejawiają swe działanie przeciwzapalne przez hamowanie enzymu syntezy prostaglandyn — powodują w żołądku i jelicie wrzody.

Jeżeli niesteroidowe środki przeciwzapalne, w pierwszym rzędzie indometacynę i pochodne kwasu acetylosalicylowego, połączy się z polisacharydami wytworzonymi sposobem według wynalazku, wówczas można usunąć działanie wrzodotwórcze tych substancji czynnych. Toksykologiczne badania wykazały, że dla koncentratów polisacharydów wytworzonych sposobem według wynalazku — na szczurach i myszach — charakterystyczna jest nadzwyczaj stroma krzywa

działania dawki. Podawana śródtrzewnowo przez 8 dni trzecia względnie dziesiąta część ostrej dawki LD<sub>50</sub> nie prowadziła praktycznie do śmierci ani u szczurów, ani u myszy.

Koncentraty wytworzone sposobem według wynalazku wykazują znakomitą aktywność właściwą i w związku z tym nadzwyczaj korzystne działanie przeciwwzapalne przy zadziwiająco niskiej toksyczności. Stosowany jako wzorzec fenylobutazon, przy dawce 100 mg/kg powodował hamowanie wynoszące 45%, natomiast w przypadku koncentratów wytworzonych sposobem według wynalazku przy takiej samej dawce hamowania wynosiło 70–80%. Podobnie korzystne wartości uzyskano przy porównaniu z indometacyną.

Biologiczne działanie można przedstawić prosto w ten sposób, iż koncentraty wytworzone sposobem według wynalazku przeprowadza się w roztwór o stężeniu 0,5%. Roztwór ten nadaje się do płukania jamy ustnej i gardła (Pharyngitis, Gingivitis), do płukania oczu (Coniunctivitis), przy schorzeniach zapalnych zewnętrznych dróg słuchowych do płukania względnie wprowadzania paska gazy nasyconego roztworem jako kompresu. Kąpiel nasiadowa przyrządzona z polisacharydów okazała się skuteczna do leczenia Fissura ani, Nodus hemorrhoidales, Vaginitis i Vulvovaginitis, a okłady stosuje się przy pęknięciach brodawki sutkowej (Rhagad) i przy zapaleniu skóry.

Poniższe przykłady wykonania objaśniają bliżej wyodrębnianie polisacharydów według wynalazku oraz ich działanie farmakologiczne.

**Przykład I.** 200 g świeżych kwiatów rumianku homogenizuje się przy jednoczesnym wodnym rozdrabnianiu w 400 ml wody. Mieszaninę pozostawia się do odstania na 20 godzin w temperaturze 20°C. Wodną fazę oddziela się przez odwirowanie, stałe substancje pozostałe w cieczy usuwa się przez sączenie. Do tak otrzymanego wodnego wyciągu dodaje się przy mieszaniu 1000 ml metanolu. Wytrąconą substancję odsącza się, przemywa metanolem i potem suszy. Tak otrzymuje się 0,3 g koncentratu polisacharydów. Jeżeli do wytrącenia zamiast metanolu użyje się 1000 ml etanolu, wówczas otrzymuje się 0,32 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład II.** 200 g suchych kwiatów rumianku rozdrabnia się w 1000 ml wody, po czym mieszaninę pozostawia się do odstania przez 2 godziny w temperaturze 20°C. Fazę wodną oczyszcza się przez odwirowanie i przesączenia, a potem zadaje 2500 ml metanolu. Wytrącony osad odsącza się i przemywa metanolem. Otrzymuje się 2,12 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład III.** 200 g świeżych kwiatów rumianku miele się i przemiał odciska. Pozostałość z odcisnięcia moczy się w 200 ml wody przez godzinę w temperaturze 20°C i potem ponownie odciska. Połączone fazy wodne sączy się i następnie przy mieszaniu zadaje 600 ml metanolu. Wytrącony osad odsącza się, przemywa metanolem i następnie suszy. Otrzymuje się 0,26 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład IV.** Postępuje się w sposób opisany w przykładzie III z tą różnicą, że wyciąg wodny zadaje się 2000 ml acetonu jako środka strącającego. Odsączony osad przemywa się acetonem i suszy. Otrzymuje się 2,43 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład V.** 200 g suchych kwiatów lipowych rozdrabnia się na mokro z 1500 ml wody. Potem mieszaninę pozostawia się do odstania przez 3 godziny w temperaturze 20°C. Po odsączeniu wyciąg wodny przerabia się w sposób opisany w przykładzie I. Otrzymuje się 1,86 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład VI.** 200 g świeżych kwiatów lipowych przerabia się w sposób opisany w przykładzie III. Otrzymuje się 0,62 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład VII.** Poddaje się mieleniu 2000 g suchych kwiatów lipowych i przemiał pozostawia do odstania przez 24 godziny w 5000 ml 60% metanolu, w temperaturze 20°C. Następnie oddziela się stałą substancję przez prasowanie i sączenie, a potem suszy w temperaturze pokojowej. Do wysuszonego materiału dodaje się 28 litrów wody, całość miesza się w temperaturze 20°C przez 24 godziny, po czym usuwa się fazę wodną przez odwirowanie. Do fazy wodnej dodaje się przy mieszaniu 56 litrów etanolu. Wytrącony osad odsącza się, przemywa etanolem i suszy. Tak otrzymuje się 47,18 g koncentratu polisacharydów. Koncentrat ten rozpuszcza się w 500 ml wody i oczyszcza przez ponowne wytrącenie za pomocą 1000 ml metanolu. Otrzymuje się 32,64 g oczyszczonego koncentratu polisacharydów.

**Przykład VIII.** 7,8 g świeżych pestek pigwy moczy się przez 24 godziny w 50 ml wody, w temperaturze +4°C. Potem sączy się mieszaninę i do fazy wodnej dodaje przy mieszaniu 100 ml metanolu. Wytrącony osad odsącza się, przemywa metanolem i potem suszy. Otrzymuje się 2,4 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład IX.** 200 g suchego siemienia lnianego ekstrahuje się 500 ml wody przez 2 godziny w temperaturze  $+36^{\circ}\text{C}$ . Po przesączeniu do fazy wodnej dodaje się 100 ml metanolu. Wytrącony osad oddziela się, przemywa metanolem i suszy. Otrzymuje się 6,79 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład X.** 200 g korzeni białego śluzu rozdrabnia się w świeżym stanie na kawałki i moczy przez 4 godziny w 400 ml wody przy temperaturze  $20^{\circ}\text{C}$ . Fazę wodną oddziela się przez odwirowanie i przy mieszaniu zadaje ją 800 ml etanolu. Wytrącony osad odsącza się, przemywa etanolem i suszy. Otrzymuje się 0,34 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład XI.** 32 kg świeżej rośliny *Kitaibela vitifolia* herba rozdrabnia się w 32 litrach wody, a następnie breję odciska przy nadciśnieniu 22,54 MPa. Otrzymuje się 50 litrów odcisniętego soku. Sok ten ogrzewa się do temperatury  $75^{\circ}\text{C}$ , po czym usuwa się wytrącone białko przez odwirowanie. Ciekłą fazę zagęszcza się do objętości 2 litrów pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałej objętości dodaje się przy mieszaniu 14 litrów metanolu. Mieszaninę pozostawia się do odstania na 24 godziny. Osad oddziela się przez odwirowanie, przemywa go metanolem i suszy w temperaturze  $60^{\circ}\text{C}$ . Otrzymuje się 87,0 koncentratu polisacharydów.

**Przykład XII.** 1 kg nasion *Trigonella foenum-graecum* (jaskier grecki) rozdrabnia się w młynku młotkowym zaopatrzonym we wkładkę rusztową o wymiarze oczka 2 mm. Przemiał miesza się przez 6 godzin z 8,7 litrami wody wodociągowej przy temperaturze  $23^{\circ}\text{C}$ . Następnie wyciąg wodny oddziela się w wirówce do oddzielania osadów. Otrzymuje się 5 litrów wodnego roztworu, który ogrzewa się do temperatury  $72^{\circ}\text{C}$ , przy czym wytrąca się białko. Usuwa się je po ochłodzeniu przez odsączenie. Do przesączu dodaje się przy mieszaniu 5 litrów n-propanolu. Mieszaninę pozostawia się do odstania w temperaturze pokojowej przez 13 godzin, a potem odwirowuje. Osad miesza się 0,5 litra n-propanolu, rozdrabnia w środowisku wodnym, a potem ponownie odwirowuje. Oddzieloną substancję stałą suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze  $45^{\circ}\text{C}$ . Otrzymuje się 50,0 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład XIII.** 1 kg dyni oczyszczonej z łupin i pestek (*Cucurbita maxima* fructus) traktuje się w udarowym młynku tarczowym w temperaturze  $20^{\circ}\text{C}$  1,5 litrami wody wodociągowej. Otrzymaną breję odciska się w prasie hydraulicznej przy nadciśnieniu 12,74 MPa. Sok z odcisnięcia sączy się przez płytkę filtracyjną Sektz'a K-5. Otrzymuje się 1500 ml przesączu, który zagęszcza się w temperaturze  $40^{\circ}\text{C}$  pod zmniejszonym ciśnieniem do zawartości suchej substancji 40%. Do zagęszczonego przesączu dodaje się przy mieszaniu 300 ml 96% etanolu. Mieszaninę zawierającą osad pozostawia się do odstania w temperaturze pokojowej 12 godzin. Następnie odsącza się substancję stałą, rozciera ją ze 100 ml 96% etanolu, sączy i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się 3,0 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład XIV.** 200 g wysuszonych liści ślazu ekstrahuje się 1 litrem wody. Wodny ekstrakt pozostawia się do odstania na 2 godziny, a następnie przerabia przez odcisnięcie fazy wodnej, odwirowania odcisniętego soku i przesączenia go. Do klarownego ekstraktu wodnego dodaje się przy mieszaniu 2 litry metanolu. Wytrącony osad odsącza się i przemywa metanolem. Otrzymuje się 2,0 g koncentratu polisacharydów.

Jeżeli jako materiał wyjściowy użyje się nie tylko wysuszone liście ślazu lecz wysuszone i zmielone w takiej samej ilości, wówczas otrzymuje się 3,5 g koncentratu polisacharydów.

Gdy wyjdzie się z wysuszonego i zmielonego ślazu ogrodowego, otrzymuje się 1,0 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład XV.** 200 g wysuszonych i zmielonych liści babki przerabia się w sposób opisany w przykładzie XIV. Otrzymuje się 0,5 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład XVI.** 200 g nasion płesznika ekstrahuje się 500 ml wody. Dalej postępuje się, jak w przykładzie XIV. Otrzymuje się 10,0 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład XVII.** 200 g wysuszonych kwiatów lipowych ekstrahuje się w sposób opisany w przykładzie V. Do klarownego ekstraktu wodnego dodaje się przy mieszaniu 30 g wodorotlenku barowego. Wytrącony osad odsącza się i przemywa najpierw alkoholem, a potem wodnym roztworem siarczanu sodowego. Otrzymuje się 2,5 g koncentratu polisacharydów.

Proces opisany w niniejszym przykładzie powtarza się, stosując jednak zamiast wodorotlenku barowego siarczan amonowy w ilości 45 g. Osad odsącza się i przemywa alkoholem. Otrzymuje się 2,0 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład XVIII.** Mieszaninę złożoną z 200 g wysuszonych i zmielonych kwiatów ślazu oraz 200 g wysuszonych i zmielonych ilości babki ekstrahuje się 2 litrami wody. Ekstrakt przerabia się w sposób opisany w przykładzie XIV. Otrzymuje się 2,7 g koncentratu polisacharydów.

**Przykład XIX.** Dynię (*Cucurbita maxima* fructus) o ciężarze 10 kg, która zawiera 15% suchej substancji, 4% redukujących i 5% nieredukujących cukrów oraz 3,0% polisacharydów, tnie się i oczyszcza od pestek. Tak przygotowaną dynię przerabia się w udarowym młynku tarczowym na breję, którą rozcieńcza się 10 litrami wody. Otrzymaną mieszaninę ogrzewa się przy mieszaniu do temperatury 35°C i przy energicznym mieszaniu utrzymuje się w tej temperaturze przez godzinę. Breję pozostawia się na 6 godzin celem odstania, a następnie odciska się ją. Otrzymuje się 12 litrów soku z odcisnięcia. Pozostałość z odcisnięcia rozprasza się w 10 litrach wody wodociągowej, miesza przez godzinę i ponownie odciska. Znowu otrzymuje się 12 litrów soku z odcisnięcia. Połączone soki z odcisnięcia mieszając ogrzewa się do temperatury 60°C. Wytrącony osad białkowy usuwa się przez odwirowanie. Odwirowany roztwór sączy się przez bibułę filtracyjną Seitz'a K-5 i osad odrzuca. Klarowny roztwór odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 60°C do zawartości suchej substancji 10–20%. Zagęszczony roztwór ochładza się do temperatury pokojowej i odwirowuje, przy czym osad odrzuca się. Do roztworu dodaje się podwójną objętość metanolu. Roztwór zawierający osad pozostawia się do odstania na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Klarowną górną fazę dekantuje się i odlewa. Roztwór zawierający osad poddaje się odwirowaniu. Osad rozdrabnia się w 500 ml metanolu, a potem odwirowuje i przemywa jeszcze 2 razy metanolem. Po trzecim rozdrobnieniu osadu roztwór z osadem podaje się na spieczoną płytkę szklaną i odciąga ług macierzysty.

Wilgotny z odciągnięcia biały osad rozdrabnia się z 10-krotną ilością destylowanej wody. Otrzymany roztwór ogrzewa się przy mieszaniu do temperatury 75°C i jeszcze na gorąco odwirowuje. Do oczyszczonego roztworu dodaje się przy mieszaniu 3-krotną objętość metanolu. Mieszaninę pozostawia się do odstania w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Potem odwirowuje się, osad rozdrabnia w 300 ml metanolu i ponownie odwirowuje. Takie przemycie metanolem powtarza się jeszcze dwa razy. Po trzecim przemyciu osad przenosi się na odsysający filtr próżniowy, odsąca i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C. Otrzymuje się 21,1 g białego, sproszkowanego koncentratu polisacharydów.

W celu dalszego oczyszczania polisacharyd rozpuszcza się w temperaturze 50°C w 600 ml destylowanej wody, roztwór odstawia się na godzinę dla odstania, a potem odwirowuje. Klarowny roztwór sączy się przez filtr membranowy przy nadciśnieniu 0,49 MPa (Diaflo XM 300, wytwórca: Amicon Co., USA), który zatrzymuje związki o ciężarze cząsteczkowym powyżej 75 000. Na wysokocząsteczkowej stronie filtra membranowego rozcieńcza się roztwór 3-krotną objętością destylowanej wody, potem powtarza się proces sączenia ciśnieniowego. Wreszcie roztwór pozostały na wysokocząsteczkowej stronie filtra poddaje się odwirowaniu i otrzymany klarowny roztwór zadaje się przy mieszaniu 3-krotną ilością metanolu. Mieszaninę pozostawia się do odstania w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Osad odciąga się na filtrze próżniowym i suszy w temperaturze 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się 13,2 g oczyszczonego koncentratu polisacharydów.

**Przykład XX.** 10 kg nasion jaskra greckiego (*Trigonella foenum graecum*) rozdrabnia się w młynku młotkowym z wkładką rusztową o wymiarze otworu 3 mm. Przemiał miesza się z 40 litrami wody o temperaturze 35°C i całość dalej miesza przez 6 godzin, po czym oddziela się w separatorze fazę ciekłą od fazy stałej. Ekstrakcję powtarza się 30 litrami wody wodociągowej w temperaturze 35°C w ciągu 3 godzin.

Połączone ekstrakty wodne ogrzewa się do temperatury 60°C i potem oczyszcza przez odwirowanie i sączenie. Do fazy ciekłej dodaje się podwójną objętość 96% etanolu, mieszając przy tym intensywnie. Przerób prowadzi się w sposób opisany w przykładzie XIX. Otrzymuje się 180 g koncentratu polisacharydów.

Po kwasowej hydrolizie można wykazać galaktozę i mannozę. Wielkokrotną część koncentratów polisacharydów wytworzonych według przykładów I–XX podano na kolumnę wypełnioną Sephadex G 75 i poddano analizie. Uzyskano następujące wyniki:

- ciężar cząsteczkowy 75 000–2 000 000
- zawartość azotu najwyżej 5%, a zawartość fosforu (wyrażona jako  $P_2O_5$ ) najwyżej 5%,
- pozostałość po prażeniu najwyżej 25%

- zawartość cukrów co najmniej 60%, w tym co najmniej 30% cukrów redukujących,
- po kwasowej hydrolizie można wykazać co najmniej dwa ze składników takich, jak glikoza, galaktoza, ksyloza, ramnoza, arabinoza, albo kwas uronowy,
- działanie przeciwzapalne, zmierzone w próbie obrzęku wywołanego karaginaną na łapie szczura jest porównywalne pod względem rzędu wielkości z działaniem fenylobutazonu lub indometacyny,
- oznaczone na myszach p.o. wartości  $LD_{50}$  wynoszą powyżej 3000 mg/kg ciężaru ciała.

**Przykład XXI.** W celu wytworzenia przeciwzapalnych czopków otrzymany według przykładu XIX koncentrat polisacharydów rozdrabnia się na cząstki o wielkości 1–5 mm. Czopki na bazie lanoliny (*Adeps solidus*) *Pharmacopes Hungarica* VI. Ed. VII. tom 1) zawierającej 5–30% masła kakaowego (*Butirum cacao*) wylewa się w temperaturze 40°C. Każdy czopek o ciężarze 3 g zawiera 0,5 g mikrocząsteczkowego polisacharydu.

**Przykład XXII.** W celu wytworzenia żelu do stosowania zewnętrznego 3% wodny roztwór Carbopol'u 934 doprowadza się do pH 7 przy użyciu 1 N ługu sodowego. Do wodnego roztworu dodano uprzednio 3% koncentratu polisacharydów wytworzonego według przykładu XIX. Żel konserwuje się dodatkiem 0,5% kwasu sorbinowego albo 0,1% nipeginy.

**Przykład XXIII.** Dla wytworzenia maści rozpuszcza się w wodzie środek konserwujący, jak w przykładzie XXII i 5% koncentratu polisacharydów wytworzonego według przykładu XX. Roztwór ten dodaje się do 1000 Unguentum emulsificane (skład: 100 g karboksytanostearynianu, 100 g parafiny, 300 g stearynianu cetylowego, 500 g *Vaselinum album*) i homogenizuje.

**Przykład XXIV.** Dla wytworzenia zawiesiny odpowiedniej do podawania doustnego, w 100 g wody rozpuszcza się 5 g koncentratu polisacharydów wytworzonego według przykładu XX. Do roztworu dodaje się 0,12 g kwasu sorbinowego, 2,8 g tlenku magnezowego, 8 g wodorotlenku glinowego, 60 g hydrożelu metylocelulozowego i 20 g sorbitu. Mieszaninę uzupełnia się do 200 ml dwukrotnie destylowaną wodą.

**Przykład XXV.** W celu wytworzenia tabletek do podawania doustnego 0,25 g koncentratu polisacharydów otrzymanego według przykładu XIX prasuje się na tabletki razem z 0,25 g Granulatum simplex o następującym składzie:

- 60 części wagowych laktozy
- 16 części wagowych sacharozy
- 20 części wagowych skrobi ziemniaczanej
- 2 części wagowe talku
- 2 części wagowe stearynianu magnezowego.

Działanie przeciwzapalne koncentratów polisacharydów wytworzonych sposobem według wynalazku badano w próbie obrzęku wywołanego karageniną na łapie szczura, po podaniu śródtrzewnym. Jednocześnie określono także toksyczność  $LD_{50}$ , po podaniu śródtrzewnym.

Uzyskane wyniki przedstawione są w tabeli I.

T a b e l a I

| Koncentrat polisacharydów                                          | Dawka<br>mg/kg | Hamowanie<br>% | $LD_{50}$<br>mg/kg |
|--------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|--------------------|
| Wytworzony z rumianku (świeże kwiaty)<br>według przykładu I        | 50             | 74,1           | 1500               |
| Wytworzony z rumianku (wysuszone kwiaty)<br>według przykładu II    | 100            | 71,1           | 1500               |
| Wytworzony z kwiatu lipowego wysuszonego<br>według przykładu XVII  | 100            | 80,3           | 1000               |
| Wytworzony z korzeni białego ślazu, świeże,<br>według przykładu X  | 100            | 54,2           | 1500               |
| Wytworzony ze świeżych pestek pigwy<br>według przykładu VIII       | 100            | 52,5           | 1000               |
| Wytworzony z wysuszonego siemienia lnianego<br>według przykładu IX | 100            | 43,8           | 1000               |
| Fenylobutazon                                                      | 100            | 45,0           | 215                |

Działanie przeciwzapalne niektórych koncentratów polisacharydów wytworzonych sposobem według wynalazku porównywano także eksperymentalnie z działaniem indometacyny. Stosowano tu taką samą próbkę obrzęku, jak wyżej. Badane polisacharydy wstrzykiwano śródtrzewnowo na godzinę przed podaniem karageniny wywołującej zapalenie. Dla porównania zastosowano podawaną doustnie indometacynę. Podano ją w postaci rozproszonej w 1% metylocelulozie przez zgłębnik żołądkowy szczurom CFY względnie myszom CFLP, godzinę przed podaniem karageniny. Podobnie postępowano przy badaniach toksyczności. Działanie przeciwzapalne, wartość  $LD_{50}$  oraz wskaźnik terapeutyczny niektórych koncentratów polisacharydów przedstawione są w tabeli II. (szczury i. p.)

T a b e l a II

| Koncentrat<br>polisacharydów                         | Działanie<br>przeciwzapalne |              | $LD_{50}$<br>mg/kg | Wskaźnik<br>terapeutyczny |                  |
|------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------|--------------------|---------------------------|------------------|
|                                                      | $ED_{50}$<br>2 h            | mg/kg<br>5 h |                    | $LD_{50}$<br>2 h          | $ED_{50}$<br>5 h |
| Wytworzony z dyni<br>według przykładu XIX            | 0,51                        | 0,37         | 112                | 219,6                     | 302,7            |
| Wytworzony z lipy<br>według przykładu VII            | 2,83                        | 2,20         | 150                | 53,0                      | 68,2             |
| Wytworzony z jaskra greckiego<br>według przykładu XX | 2,19                        | 1,17         | 200                | 91,3                      | 180,9            |
| Indometacyna (p. o.)                                 | 3,14                        | 2,20         | 32                 | 10,2                      | 14,5             |

W tabeli III przedstawiona jest siła działania koncentratów polisacharydów wytworzonych sposobem według wynalazku w porównaniu z siłą działania indometacyny. Względną siłę działania przedstawia iloraz  $ED_{50}$  indometacyny i  $ED_{50}$  polisacharydu.

T a b e l a III

| Koncentrat<br>polisacharydów                         | Względna siła działania |        |
|------------------------------------------------------|-------------------------|--------|
|                                                      | po 2 h                  | po 5 h |
| Wytworzony z dyni<br>według przykładu XIX            | 6,16                    | 5,95   |
| Wytworzony z lipy<br>według przykładu VII            | 1,11                    | 1,00   |
| Wytworzony z jaskra greckiego<br>według przykładu XX | 1,43                    | 1,88   |

W tabeli IV przedstawione jest porównanie niektórych danych farmaceutycznych koncentratów polisacharydów wytworzonych sposobem według wynalazku z danymi szeroko stosowanych substancji przeciwzapalnych.

T a b e l a IV

| Koncentrat<br>polisacharydów  | Dawka<br>mg/kg | Działanie<br>przeciwza-<br>palne, % | $LD_{50}$<br>mg/kg | Dawka<br>$LD_{50}$ |
|-------------------------------|----------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Wytworzony z dyni             | 10             | 54                                  | 214                | 0,046              |
| Wytworzony z jaskra greckiego | 10             | 40                                  | 250                | 0,040              |
| Indometacyna p. o.            | 10             | 51                                  | 17                 | 0,580              |
| Fenyllobutazon p.o.           | 90             | 40                                  | 470                | 0,190              |
| Aspiryna p.o.                 | 400            | 36                                  | 1200               | 0,330              |

Koncentraty polisacharydów wytwarzane sposobem według wynalazku wykazują znakomite działanie także w przypadku przewlekłych zapaleń. Tabela V przedstawia działanie trójtęgodniowego leczenia adjuwanter Arthritis na szczurach.

T a b e l a V

| Koncentrat<br>polisacharydów  | Dawka<br>mg/kg | Działanie<br>przeciw-<br>zapalne, % |
|-------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| Wytworzony z dyni             | 50             | 46                                  |
| Wytworzony z dyni             | 10             | 46                                  |
| Wytworzony z jaskra greckiego | 50             | 37                                  |
| Fenylbutazon                  | 50             | 64                                  |

## Z a s t r z e ż e n i a   p a t e n t o w e

1. Sposób wytwarzania biologicznie czynnych koncentratów polisacharydów, zwłaszcza o działaniu przeciwzapalnym, o ciężarze cząsteczkowym zawartym pomiędzy 75 000 i 2 000 000, z roślin należących do rodzin dyniowatych (Cucurbitaceae), motylkowych (Papilionaceae), lipowatych (Tiliaceae), wargowych (Labiatae), ślazowatych (Malvaceae), złożonych (Asteraceae), baldaszkowatych (Umbelliferae), rutowatych (Rutaceae), komosowatych (Chenopodiaceae), lnowatych (Linaceae), różowatych (Rosaceae) i babkowych (Plantaginaceae), a zwłaszcza kwiatu rumianku (*Chamomillae flos*), kwiatu lipy (*Tiliae flos*), korzenia białego ślazu (*Altheae radix*), liści i kwiatu ślazu (*Malvae folium et flos*), ślazu ogrodowego (*Malvae arborease herba*), liści babki (*Plantaginis folium*), nasion płesznika (*Psellii semen*), nasion pigwy (*Cydoniae semen*), siemienia lnianego (*lini semen*), nasion jaskra greckiego (*Trigonella foeni-graeci semen*), owocu dyni (*Cucurbita maximae fructus*), ziela Kitaibella witifolia lub ich mieszanin, poprzez macerację wodą i wytrącanie alkoholem, **znamienny tym**, że suszony lub świeży, ewentualnie potraktowany uprzednio rozpuszczalnikiem organicznym, surowiec roślinny maceruje się z wodą w stosunku 1 : 5-20 w ciągu 1-24 godzin, w temperaturze 15-40°C, oddziela się fazę stałą ewentualnie z części ciekłej oddziela się w temperaturze 40-80°C osad białek, a następnie dodaje się 1 : 3 objętości alkoholu zawierających 1-3 atomów węgla, aceton lub 1-3 wartościowe kationy, wytrącając koncentrat polisacharydów, który oddziela się od fazy wodnej za pomocą wirowania i/lub filtrowania i ewentualnie otrzymany surowy produkt oczyszcza się przez wielokrotne wytrącanie z alkoholu.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że świeże rośliny lub nawodnione suszone rośliny miele się lub rozdrabnia, odciska otrzymaną breję, pozostałość po odcisnięciu ponownie traktuje się wodą i ponownie odciska.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że surowy koncentrat polisacharydów rozpuszcza się w 30-40 krotnej ilości wody w temperaturze 50-75, roztwór oczyszcza się przez odwirowanie, a następnie filtruje się pod ciśnieniem przez filtr membranowy przepuszczający substancje o ciężarze cząsteczkowym poniżej 75 000, a z roztworu pozostałego po wysokocząsteczkowej stronie filtra wytrąca się alkoholem polisacharydy.