



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75973** (13) **U**
(51) МПК
A61K 36/28 (2006.01)
A61K 135/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2012 04506</p> <p>(22) Дата подання заявки: 10.04.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.12.2012</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.12.2012, Бюл.№ 24</p>	<p>(72) Винахідник(и): Волочай Вікторія Іванівна (UA), Ковальов Володимир Миколайович (UA), Штриголь Сергій Юрійович (UA), Койро Ольга Олегівна (UA), Товчига Ольга Володимирівна (UA), Краснікова Тетяна Олександрівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)</p>
--	--

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОЛІФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ З ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЮ АКТИВНІСТЮ З ГАЛІНСОГИ ДРІБНОКВІТКОВОЇ

(57) Реферат:

Спосіб одержання поліфенольного комплексу з гепатопротекторною активністю шляхом екстракції подрібненої рослинної сировини етанолом, упарювання до водного залишку, очищення хлороформом з подальшим сушінням, причому як рослинну сировину використовують траву галінсоги дрібноквіткової (*Galinsoga parviflora* Cav.), екстракцію здійснюють 10-кратною кількістю 69-71 % етанолу протягом 12-13 годин, одержаний екстракт концентрують до 1/20 початкового об'єму та очищують хлороформом при співвідношенні водного залишку до хлороформу як 1:1.

UA 75973 U

Корисна модель належить до фармації та медицини, а саме до способів одержання комплексів біологічно активних речовин із рослинної сировини з гепатопротекторною дією з подальшим їх використанням як лікарських субстанцій при створенні препаратів у різних лікарських формах.

5 Останнім часом спостерігається тенденція до значного збільшення частоти захворювань печінки та жовчовивідних шляхів. За даними ВООЗ, число хворих із різною патологією гепатобіліарної системи перевищує 2 млрд. осіб [1]. В Україні за останні 10 років поширеність хронічних гепатитів і цирозів печінки збільшилася щонайменше в 2,5 рази. Комплексна терапія захворювань печінки різного генезу вимагає використання безпечних багатофункціональних препаратів - гепатопротекторів, які сприяють збереженню та відновленню пошкоджених тканин печінки [2]. З цих позицій представляють інтерес поліфенольні сполуки природного походження, що виявляють антиоксидантний ефект, потенціюють ендогенні антиоксидантні системи гепатоцитів, тощо [3].

15 Відомий спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин, що має гепатопротекторну дію [4]. Спосіб здійснюють шляхом екстрагування подрібненої сухої трави гороху посівного 10-кратною кількістю 49-51 % етанолу протягом 11-12 годин. Одержаний екстракт упарюють до водного залишку, який очищують від речовин ліпофільної природи хлористим метиленом при співвідношенні водний залишок: хлористий метилен 3:4 з подальшим сушінням до сухого залишку.

20 Недоліком цього способу можна вважати надмірні витрати хлористого метилену.

За прототип вибрано відомий спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з гіпоазотемічною, гепатопротекторною, антиоксидантною та протизапальною активністю [5], згідно з яким як рослинну сировину використовують листя робінії псевдоакації, екстракцію здійснюють 12-кратною кількістю 29-31 % етанолу протягом 13-15 годин. Одержаний після упарювання при температурі 65 °С водний залишок додатково відстоюють протягом 12 годин і фільтрують, а очищення хлороформом здійснюють при співвідношенні водного залишку та хлороформу як 2:1 у чотири етапи.

30 До недоліків способу за прототипом можна віднести необхідність відстоювання об'єднаного та сконцентрованого екстракту протягом 12 годин, що призводить до адсорбції значної кількості фенольних сполук на осаді речовин ліпофільної природи та збільшення часових затрат на здійснення вище наведеного способу.

35 Задачею корисної моделі є створення економічно доцільного способу отримання поліфенольного комплексу рослинного походження з гепатопротекторною активністю, який завдяки використанню нетрадиційної сировини, а саме трави галінсоги дрібноквіткової, у поєднанні з сукупністю параметрів заявленого способу забезпечує одержання кінцевого продукту з вираженою фармакологічною дією.

40 Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі одержання поліфенольного комплексу з гепатопротекторною активністю шляхом екстракції подрібненої рослинної сировини етанолом, упарювання до водного залишку, очищення хлороформом з подальшим сушінням, згідно з корисною моделлю передбачено, що як рослинну сировину використовують траву галінсоги дрібноквіткової (*Galinsoga parviflora* Cav.), екстракцію здійснюють 10-кратною кількістю 69-71 % етанолу протягом 12-13 годин, одержаний екстракт концентрують до 1/20 початкового об'єму та очищують хлороформом при співвідношенні водного залишку до хлороформу як 1:1.

45 Всі параметри заявленого способу визначено експериментальним шляхом з урахуванням біологічної активності одержаних комплексів, ефективності, доступності реактивів.

50 Галінсога дрібноквіткова (*Galinsoga parviflora* Cav.) - неофіційна рослина, проте її застосовують у народній медицині. Траву використовують як кровоспинний, ранозагоювальний, протицинготний, гіпотензивний та матковий засіб. Її жують при стоматитах, гінгівітах, пошкодженнях слизової оболонки ротової порожнини. Крім того, коріння вважають жарознижуючим засобом. Експериментально підтверджена кровоспинна дія препарату на матку, вплив на артеріальний тиск не відмічено [6].

Авторами вперше було досліджено гепатопротекторну дію фенольних сполук із трави галінсоги дрібноквіткової, не відому з джерел інформації.

55 Дослідним шляхом було визначено, що оптимальним екстрагентом для вилучення фенольних сполук з вибраної сировини є 70 % етанол. Визначені експериментальним шляхом такі ознаки, як кількісне співвідношення сировини до екстрагенту 1:10 та тривалість екстракції протягом 12-13 годин, є необхідними і достатніми для ефективного здійснення заявленого способу і одержання кінцевого продукту з очікуваним видом активності.

60 Спосіб здійснюється таким чином. Подрібнену до розміру часток 2,0-3,0 мм суху траву галінсоги дрібноквіткової екстрагують методом перколяції 10-кратною кількістю 69-71 % етанолу

протягом 12-13 годин. Одержаний екстракт концентрують під вакуумом при температурі 50-60 °С до 1/20 початкового об'єму та очищують від речовин ліпофільної природи хлороформом у співвідношенні водний залишок - хлороформ 1:1 з подальшим сушінням до сухого залишку.

В результаті здійснення заявленого способу одержують поліфенольний комплекс у вигляді сухого екстракту, що відповідає вимогам Державної фармакопеї України [7]. Він являє собою порошок жовтого кольору, втрата в масі при висушуванні не перевищує 5 %, розчинний у спирто-водних сумішах, гарячій воді, малорозчинний у метанолі та етанолі. Його вихід складає 10-12 %.

Корисна модель ілюструється прикладами.

10 Приклад 1

5 кг подрібненої до 2,0-3,0 мм сухої трави галінсоги дрібноквіткової вміщують у перколятор та екстрагують 70 % етанолу протягом 12,5 години зі швидкістю збору екстракту 4 л/год. Одержаний екстракт (50 л) упарюють при температурі 50 °С під вакуумом у вакуум-циркуляційному апараті, до водного залишку обсягом 2,5 л. Водний залишок після охолодження до кімнатної температури очищують хлороформом в реакторі з мішалкою в 5 етапів, додаючи послідовно по 2,5 л хлороформу на кожному етапі з подальшим перемішуванням протягом 10 хвилин і відстоюванням протягом 2 години на кожному етапі. Одержаний водний концентрат висушують у вакуум-сушильній шафі до отримання сухого екстракту.

Приклад 2

20 Вивчення гепатопротекторної дії поліфенольного комплексу з трави галінсоги дрібноквіткової, одержаного за заявленим способом проводили на моделі гострого токсичного ураження печінки тетрахлорметаном (ТХМ) [3], який вводили внутрішньо-шлунково мишам у вигляді 50 % олійного розчину в дозі 10 мл/кг одноразово. За препарат порівняння обрано Силібор.

25 Для визначення гепатопротекторної активності досліджуваний препарат та препарат порівняння вводили тваринам внутрішньошлунково у лікувально-профілактичному режимі протягом 3 днів. На третій день введення препаратів проводили за 1 годину до та через 2 години після впливу токсину. Поліфенольний комплекс застосовували у формі водного розчину в дозі 50 мг/кг, 200 мг/кг та 500 мг/кг. Препарат порівняння Силібор - в дозі 200 мг/кг [3]. Тварини груп інтактного контролю та модельної патології одержували внутрішньошлунково питну воду в еквівалентному об'ємі.

Лабораторних тварин (рандомбредні миші самці масою 15-20 г) розподілили на групи відповідно до препарату, що вони одержували, та його дози:

- 35 1. Інтактний контроль, n=13.
2. Модельна патологія (ТХМ), n=13.
3. Поліфенольний комплекс з трави галінсоги дрібноквіткової (50мг/кг) + ТХМ, n=8.
4. Поліфенольний комплекс з трави галінсоги дрібноквіткової (200мг/кг) + ТХМ, n=8.
5. Поліфенольний комплекс з трави галінсоги дрібноквіткової (500мг/кг) + ТХМ, n=8.
- 40 6. Силібор (200 мг/кг) + ТХМ, n=9.

Через добу після введення токсину мишей декапітували під легким ефірним наркозом. Гепатопротекторну дію препаратів оцінювали за активністю трансамінази сироватки крові. Також враховували коефіцієнт маси печінки, що характеризував ступінь вираженості запального процесу в органі та вказував на тяжкість ураження гепатоцитів [3].

45 Визначення активності аланінамінотрансферази (АлАТ) в сироватці крові проводилося спектрофотометричним методом, який базується на тому, що кінцеві продукти трансамінування (глутамінова та піровиноградна кислоти) реагують з динітрофенілгідразином у лужному середовищі з утворенням забарвленого комплексу. Інтенсивність забарвлення при 540 нм прямо пропорційна активності ферменту. Останню визначали за калібрувальним графіком [8]. Розраховували коефіцієнт маси печінки (співвідношення маси органу до маси тіла тварин) [3].

50 Результати дослідження наведені в таблиці.

Введення тетрахлорметану супроводжувалося зростанням активності маркерного ферменту цитолізу АлАТ у плазмі крові майже в 4 рази. Поліфенольний комплекс галінсоги дрібноквіткової достовірно знижував цей показник та виявився однаково ефективним в усіх використаних дозах.

Дослідження гепатопротекторної активності полі фенольного комплексу з трави галінсоги дрібноквіткової у тварин з тетрахлорметановим гепатитом

Група дослідних тварин	Масовий коефіцієнт печінки, %		АлАТ, ммоль/(год·л)	
	n	M±m	n	M±m
Інтактний контроль	13	5,09±0,11	7	1,10±0,19
Модельна патологія (ТХМ)	13	6,28±0,24*	7	4,34±0,02*
Поліфенольний комплекс (50 мг/кг) + ТХМ	8	5,51±0,29 [#]	8	2,56±0,06 ^{*#&}
Поліфенольний комплекс (200 мг/кг) + ТХМ	8	5,55±0,23 [#]	8	2,78±0,06 ^{*#}
Поліфенольний комплекс (500 мг/кг) + ТХМ	8	5,08±0,24 ^{#&}	8	2,79±0,12 ^{*#}
Силібор (200 мг/кг) + ТХМ	9	5,95±0,27*	9	3,17±0,18 ^{*#}

Примітка. * - достовірні відмінності відносно групи інтактного контролю (p<0,05);

- достовірні відмінності відносно групи модельної патології (p<0,05),

& - достовірні відмінності відносно групи, що отримувала силібор (p<0,05).

5 За ступенем вираженості впливу на активність АлАТ досліджуваний препарат у дозах 200 мг/кг та 500 мг/кг достовірно не відрізнявся від Силібору, а у дозі 50 мг/кг перевищував його за активністю. Про розвиток запального ураження органу свідчило збільшення коефіцієнту маси печінки у тварин групи модельної патології. Застосування поліфенольного комплексу знижувало його до рівня інтактних тварин. Аналогічна динаміка спостерігалася у групі препарату порівняння, проте показник не досяг статистично достовірної відмінності від групи контролю. Таким чином, застосування поліфенольного комплексу галінсоги дрібноквіткової попереджує цитоліз гепатоцитів та знижує запальні процеси в печінці, що свідчить про його гепатопротекторні властивості.

10 Ймовірно, механізм гепатопротекторної дії поліфенольного комплексу галінсоги дрібноквіткової може бути зумовлений зв'язуванням токсичних вільних радикалів та стабілізацією клітинних мембран фенольними сполуками, які входять до його складу.

15 Таким чином, поліфенольний комплекс із трави галінсоги дрібноквіткової, одержаний за заявленим способом, сприятливо впливає на перебіг гострого токсичного гепатиту, а отже чинить гепатопротекторну дію. Завдяки цьому він може бути рекомендований для лікування та профілактики захворювань, які супроводжуються ураженням печінки, що дозволяє розширити арсенал відомих гепатопротекторів та індивідуалізувати фармакотерапію.

20 Заявлений спосіб є економічно доцільним і простим у виконанні.

Джерела інформації:

1. Бакулин І. Г. Возможности применения гепатопротекторов в практике врача-терапевта / И. Г. Бакулин, Ю. Г. Сандлер // Consilium medicum. Гастроэнтерология.-2010. - № 8.- С. 72-76.

25 2. Попович В. П. Дослідження асортименту гепатопротекторів на фармацевтичному ринку України / В. П. Попович // Фармакологія та лікарська токсикологія.-2011. - №1 - С.-75-81.

3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. чл.-корр. РАМН Р.У. Хабриева. - М.: Медицина, 2005. - С. 683-686.

30 4. Патент на винахід №30879, Україна, МПК 7 А61К 35/78, А61К 9/20, А61Р 1/16, з. №98063104, заявл. 16.06.1998, опубл. 16.06.2003, Бюл. №6. 5. Патент на винахід 84336, Україна, МПК, А61К 36/483, А61К 127/00, А61Р 1/16, А61Р 13/12, заявл. 20.11.2006, опубл. 10.10.2008, Бюл. № 19.

6. Фруентов Н. К. Лекарственные растения Дальнего Востока / Фруентов Н. К. -Хабаровск: Кн. изд-во, 1987. - С. 33-34.

35 7. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр".-1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - Доповнення 1.-2004. - С 271-273.

8. Камышников В.С. Справочник по клинико-химической лабораторной диагностике: в 2 т. Т. 1.-2-е изд. - Мн.: Беларусь, 2002. - С. 382-395.

40

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5 Спосіб одержання поліфенольного комплексу з гепатопротекторною активністю шляхом екстракції подрібненої рослинної сировини етанолом, упарювання до водного залишку, очищення хлороформом з подальшим сушінням, який **відрізняється** тим, що як рослинну сировину використовують траву галінсоги дрібноквіткової (*Galinsoga parviflora* Cav.), екстракцію здійснюють 10-кратною кількістю 69-71 % етанолу протягом 12-13 годин, одержаний екстракт концентрують до 1/20 початкового об'єму та очищують хлороформом при співвідношенні водного залишку до хлороформу як 1:1.

10

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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