



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110947** (13) **C2**
(51) МПК
A61P 25/22 (2006.01)
A61K 36/50 (2006.01)
A61K 135/00 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2013 04353**
(22) Дата подання заявки: **08.04.2013**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.03.2016**
(41) Публікація відомостей про заяву: **10.10.2014, Бюл.№ 19**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.03.2016, Бюл.№ 5**

(72) Винахідник(и):
**Цивунін Вадим Володимирович (UA),
Прокопенко Юлія Сергіївна (UA),
Штриголь Сергій Юрійович (UA),
Георгіянець Вікторія Акіпівна (UA)**

(73) Власник(и):
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
UA 106117 C2, 25.07.2014
UA 85892 C2, 10.03.2009
UA 62370 U, 25.08.2011
UA 59816 A, 15.09.2003
RU 2155062 C1, 27.08.2000

Бурчинський С.Г. Комбіновані засоби фармакотерапії невротичних і неврозоподібних розладів // Укр. мед. часопис. - № 6 (38). - 2003. - С. 45-48
Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева.-2-изд., перераб. и доп. - М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005. - С. 257-258

Державний формуляр лікарських засобів. Випуск четвертий. - К., 2012. - С. 303-308
Компендиум 2000/2001 - лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. - Киев: Морион, 2000. - С. Л-173-174

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНОГО ЗАСОБУ У ФОРМІ СУХОГО ЕКСТРАКТУ РУТКИ ШЛЕЙХЕРА ЯК АГЕНТА, ЩО ПРОЯВЛЯЄ АНКСІОЛІТИЧНУ ДІЮ

(57) Реферат:

Винахід належить до фармації та медицини, а саме до засобів рослинного походження з анксиолітичною дією. Суть винаходу полягає в застосуванні лікувально-профілактичного засобу на основі водного екстракту надземної частини рутки Шлейхера, що виявляє анксиолітичний ефект.

UA 110947 C2

Винахід належить до фармації та медицини, а саме до засобів рослинного походження з анксиолітичною дією.

Неврози, неврозоподібні розлади та інші патологічні стани, що супроводжуються тривожністю та відчуттям неспокою, посідають перше місце в структурі психічних захворювань. В останні десятиліття поширеність цих хвороб невпинно зростає. Цьому сприяють висока розповсюдженість психоемоційних стресів, фізична перевтома, зловживання алкогольними напоями та тютюном, що характерно для сьогочасного суспільства [1]. Саме тому раціональне лікування тривожних станів нині є проблемою глобального масштабу.

В терапії вищезазначених патологічних станів здебільшого використовуються лікарські засоби, що належать до групи транквілізаторів, перш за все бензодіазепінового ряду. Анксиолітичний ефект цих препаратів виявляється усуненням страху, тривоги, відчуття неспокою [2]. Однак навіть їх нетривале застосування в терапевтичних дозах спричиняє розвиток фізичної та психічної залежності, синдрому відміни, а також інших небажаних побічних ефектів, зокрема з боку центральної нервової системи, такі як сонливість, седацію, зниження уваги та інших когнітивних функцій, швидкості психомоторних реакцій, м'язового тону, порушення координації рухів [3].

Відомий препарат діазепам належить до класичних транквілізаторів, володіє виразним анксиолітичним, протисудомним та снодійним ефектами, пов'язаними зі стимуляцією бензодіазепінових рецепторів, підвищенням активності ГАМК та ГАМК-ергічних гальмівних процесів. На сьогодні цей лікарський засіб широко використовується в фармакотерапії неврозів та інших близьких за патогенезом та клінічними проявами синдромів. Проте для нього характерний весь спектр вищенаведених небажаних побічних реакцій.

В останні роки спостерігається тенденція до пошуку нових лікарських засобів, які б володіли вибірковим впливом на окремі ланки патогенезу різних захворювань центральної нервової системи. Внаслідок цього значно зменшуватиметься ризик розвитку небажаних побічних реакцій при високому рівні ефективності. Тому в цьому випадку доцільні розробка та використання фітопрепаратів, які зазвичай відрізняються високим ступенем безпечності навіть при тривалому застосуванні. Отже, створення нових лікарських засобів в межах даної фармакотерапевтичної групи є актуальною проблемою.

Задачею винаходу є створення нового засобу рослинного походження з достовірною анксиолітичною дією, з доступної сировини за простою технологією.

Поставлена задача вирішується таким чином, що лікувально-профілактичний засіб із анксиолітичною дією на основі рослинної сировини, згідно з винаходом, виконаний у формі сухого екстракту рутки Шлейхера (*Fumaria schleicheri* Soy.-Willem.) із використанням води як екстрагенту при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10.

Рутка Шлейхера (*Fumaria schleicheri* Soy.-Willem.) - однорічна трав'яниста рослина родини руткові (*Fumariaceae*) - є перспективним об'єктом для фармакологічного вивчення завдяки своєму різноманітному фітохімічному складу. До того ж рослина широко розповсюджена на території України, що виключає проблему пошуку сировинної бази [4].

Рутка Шлейхера є допустимою домішкою до офіційної рослини - рутки лікарської (*Fumaria officinalis* L., *Fumariaceae*), застосування якої в медицині відоме: рослина регулює секреторну діяльність печінки, шлунка і кишечника, підсилює апетит, зміцнює загальний тонус організму після перенесених важких, виснажливих інфекційних захворювань і великої втрати крові, сприятливо впливає на роботу серця, звужує кровоносні судини, тонізує гладку мускулатуру матки.

У літературі відсутні дані про наявність анксиолітичної активності в екстракційних препаратах рутки Шлейхера.

Заявлений засіб отримують методом бісмацерації згідно з ДФУ з використанням води очищеної як екстрагента [5].

Одержаний екстракт у сухому вигляді якісно відрізняється за своїми технологічними параметрами: характеризується задовільними сипкими властивостями, а також незначною гіроскопічністю, що забезпечує стійкість засобу при зберіганні.

Одержаний екстракт стандартизують за вмістом алкалоїдів групи ізохіноліну та за вмістом флавоноїдів.

Винахід ілюструється прикладами.

Заявлений засіб отримують простим, доступним способом.

Повітряно-суху лікарську рослинну сировину подрібнювали на порошок до розміру часток, що проходять крізь сито з отворами розміром 0,5 мм. Після чого її вміщували в екстрактор та додавали воду очищену при співвідношенні сировина-екстрагент 1:10. Екстракцію проводили при температурі 80 °C протягом 2 годин. Процес повторювали 3-4 рази до повного вилучення

комплексу біологічно активних речовин з сировини. Отримані екстракти об'єднували, фільтрували і концентрували у вакуум-випарному апараті при температурі 50-60 °С і тиску 80-87 кПа до густої консистенції. Отриманий напівпродукт піддавали сушінню у вакуум-сушильній шафі до залишкової вологості 5 %.

5 Отриманий кінцевий продукт - порошок коричневого кольору та однорідного складу, із слабким специфічним запахом.

Приклад 1

Стандартизацію екстракту за вмістом алкалоїдів проводили методом УФ-спектрофотометрії. 0,1 г сухого екстракту розчинили у 10 мл розведеного розчину аміаку. Отриманий розчин перенесли у ділильну лійку та струшували 2 рази, кожний раз з 5 мл хлороформу. Об'єднані хлороформні витяжки струшували 3 рази, кожний раз з 5 мл кислоти сірчаної розведеної. Сірчанокислу витяжку довели до лужної реакції за допомогою концентрованого розчину аміаку, перенесли у ділильну лійку та струшували 2 рази, кожний раз з 5 мл хлороформу. Хлороформні фракції випарили досуха, сухий залишок розчинили у 2 мл спирту етилового 50 %-вого. Аліквоту 15 1 мл спиртового розчину помістили у мірну колбу місткістю 50 мл, додали 10 мл спирту етилового 50 %-вого, перемішали та довели тим же самим розчинником до позначки. Вимірювали оптичну густину отриманого розчину у діапазоні хвиль від 220 до 350 нм. УФ-спектр випробовуваного розчину, виготовленого з екстракту з трави рутки Шлейхера характеризувався наявністю двох максимумів поглинання за довжинами хвиль 292 та 320 нм. Наведений спектр за своїми максимумами поглинання був достатньо близьким до УФ-спектра стандартної речовини носкапіну гідрохлориду, отриманого за тих же умов, що може бути свідченням переважної кількості саме цієї групи алкалоїдів у екстракті. Отримані дані були проаналізовані, та був розрахований вміст суми алкалоїдів у екстракті з трави рутки Шлейхера у перерахунку на носкапін при аналітичній довжині хвилі 320 нм.

25 Розрахунок вмісту суми алкалоїдів у екстракті методом спектрофотометрії проводили за формулою:

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 2 \cdot 50 \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 0.1 \cdot 1 \cdot (100 - d)}, \text{ де}$$

A_1 - питомий показник поглинання досліджуваного розчину за довжини хвилі 320 нм;

30 A_0 - питомий показник поглинання стандартного розчину (носкапіну) за довжини хвилі 320 нм;

m_0 - маса наважки стандартної речовини для приготування стандартного розчину;

d - сухий залишок досліджуваного екстракту, %.

35 В таблиці 1 наведені результати кількісного визначення та метрологічні характеристики методики кількісного визначення алкалоїдів у екстракті з трави рутки Шлейхера методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ- та видимій області.

Таблиця 1

Результати кількісного визначення та метрологічні характеристики методики кількісного визначення алкалоїдів у екстракті з трави рутки Шлейхера методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ- та видимій області

Субстанція	X_{cp}	S^2	S_{cp}	$X_{cp} \pm \Delta x$	$\epsilon, \%$
Екстракт	0,400	0,002·10 ³	0,0003	0,40±0,006*	0,145
* $p \leq 0,05$; $t(P, v) = 2,15$					

40 Отримані результати знаходяться у рамках мінімально допустимого значення вмісту алкалоїдів у екстракті, що свідчить про те, що даний спосіб дозволяє отримувати коректні результати.

В результаті визначення валідаційних параметрів запропонованої методики (відтворюваності, робастності, сходимості та лінійності) було встановлено, вона є валідною та може бути використана в подальшому для стандартизації заявленого засобу.

Приклад 2

45 Стандартизацію екстракту за вмістом флавоноїдів проводили методом абсорбційної УФ-спектрофотометрії. Оскільки у складі екстракту флавоноїди представлені двома значними підгрупами - флавонолами та флавонами, набуло цікавості питання щодо їх сумісного

визначення спектрофотометричним методом. Аналіз літературних джерел показав, що додавання розчину алюмінію (III) хлориду приводить до більш сильного батохромного зсуву максимумів поглинання флавонолів у порівнянні з флавонами.

0,1 г екстракту розчинили у 2 мл гарячої води. Аліквоту 1 мл розчину перенесли у мірну колбу місткістю 50 мл, додали 10 мл спирту етилового 50 %-вого, перемішали. Додали 4 мл розчину алюмінію хлориду 50 г/л, через 10 хвилин додали 2 мл розчину кислоти оцтової 50 г/л та довели спиртом етиловим 50 %-вим до позначки. Через 1 годину вимірювали оптичну густину досліджуваного розчину у діапазоні хвиль 350-500 нм. Спостерігали наявність максимуму поглинання за довжини хвилі 404 нм.

Для приготування компенсаційного розчину аліквоту 1 мл розчину екстракту помістили у мірну колбу місткістю 50 мл, додали 10 мл спирту етилового 50 %-вого, перемішали, додали 2 мл розчину кислоти оцтової 50 г/л.

Розрахунок вмісту суми флавоноїдів у екстракті проводили за формулою:

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 2 \cdot 50 \cdot 100}{A_0 \cdot 100 \cdot 0.1 \cdot 1 \cdot (100 - d)}, \text{ де}$$

A_1 - питомий показник поглинання досліджуваного розчину за довжини хвилі 404 нм;

A_0 - питомий показник поглинання стандартного розчину (рутину) за довжини хвилі 408 нм;

m_0 - маса наважки стандартної речовини для приготування стандартного розчину;

d - сухий залишок досліджуваного екстракту, %.

В таблиці 2 наведені результати кількісного визначення та метрологічні характеристики методики кількісного визначення флавоноїдів у екстракті з трави рутки Шлейхера методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ- та видимій області.

Таблиця 2

Результати кількісного визначення та метрологічні характеристики методики кількісного визначення флавоноїдів у екстракті з трави рутки Шлейхера методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ- та видимій області

Субстанція	$X_{\text{ср}}, \%$	S^2	$S_{\text{ср}}$	$X_{\text{ср}} \pm \Delta x, \%$	$\epsilon, \%$
Екстракт	1,08	0,00001	0,002	1,08±0,004	0,40
* $p \leq 0,05$; $t(P, \nu) = 2,15$					

З метою підтвердження обґрунтованості даної методики для визначення флавоноїдів була проведена її валідація. При проведенні процедури валідації було обрано діапазон застосування 80 % - 120 %. Розрахунок критеріїв прийнятності методики було проведено відповідно до вимог ДФУ, враховуючи стандартизовану процедуру проведення валідації: допуски вмісту $B = \pm 2 \%$, максимально допустима повна невизначеність $\max_{A_S} = 2,0 \%$; максимальної систематичної похибки $\max \delta = 0,64 \%$; критичне значення залишкового стандартного відхилення $\max s_0 = 1,06$; критичне значення індексу кореляції $r = 0,9998$.

Приклад 3

Для вивчення анксиолітичної (транквілізуювальної) дії заявленого засобу використовували тест піднесеного хрестоподібного лабіринту, що дозволяє дослідити рівень тривожності тварин. Тест базується на природному страху висоти та униканні гризунами освітлених просторів [6]. Для дослідження було відібрано 40 рандомбредних білих мишей обох статей масою 15-29 г, яких розподілили на групи відповідно до препарату, що вони його одержували. Враховуючи суттєвий вплив зовнішніх факторів та значну тривалість у часі поведінкових методик, для кожної групи, що отримувала заявлений засіб та препарат порівняння діазепам, використовували власний контроль:

1. Заявлений засіб, 100 мг/кг (n=14);

2. Діазепам, 10 мг/кг (n=26).

З метою визначення анксиолітичної активності використано режим профілактичного введення заявленого засобу. Заявлений засіб у вигляді водного розчину сухого екстракту в дозі 100 мг/кг, а також препарат порівняння - діазепам у дозі 10 мг/кг - вводили внутрішньошлунково протягом 3 днів, востаннє за 30 хв до проведення тесту. Мишам контрольних груп у такому ж режимі вводили у шлунок воду очищену в аналогічному об'ємі (0,1 мл на 10 г маси тіла).

- Оцінку анксиолітичної дії проводили за такими показниками: латентний період входу до темної камери, час знаходження на освітлених ділянках, час перебування в темних рукавах, відвідування центральної площадки, освітлених та темних рукавів, а також прояви вегетативного супроводу емоційних реакцій (болюси, уринації, сума). Для оцінки статистичної значущості відмінності результатів використовували параметричний t-критерій Стьюдента та непараметричний U-критерій Манна-Уїтні. Результати дослідження наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Дослідження впливу заявленого засобу та препарату порівняння на тривожність мишей за тестом піднесеного хрестоподібного лабіринту (M±m)

Показники	Діазепам, 10 мг/кг		Заявлений засіб, 100 мг/кг	
	Контроль (n=13)	Дослід (n=13)	Контроль (n=7)	Дослід (n=7)
Латентний період входу до темної камери, с	5,8±2,5	27,5±10,1**	3,3±1,1	22,1±16,8
Час знаходження в освітлених рукавах, с	82,9±24,0	215,0±34,0**	9,1±2,1	114,4±20,6**
Час знаходження в темних рукавах, с	216,0±23,0	86,9±33,8**	291,1±2,0	185,6±20,6**
Відвідувань освітлених рукавів	2,4±0,8	4,4±0,7*	0,14±0,14	5,0±0,6**
Відвідувань темних рукавів	1,8±0,6	4,1±0,8*	2,3±0,6	9,9±1,7**
Відвідувань центральної площадки	3,7±1,4	7,1±1,3	1,3±0,6	4,1±1,2*
Вегетативний супровід емоційних реакцій:				
полюси	1,4±0,4	0,23±0,1	1,7±0,8	3,4±0,7
уринації	0	0,08±0,08	0,14±0,14	0,14±0,14
сума	1,4±0,4	0,31±0,11*	1,84±0,9	3,54±0,8

Примітки:

- * - достовірні відмінності з показником контролю (p<0,05);
- ** - достовірні відмінності з показником контролю (p<0,01).

- Аналіз даних таблиці 3 свідчить, що заявленому засобу притаманна виражена анксиолітична дія. За її виразністю заявлений засіб в дозі 100 мг/кг практично не поступається препарату порівняння діазепаму в дозі 10 мг/кг. Останній в умовах досліду спричиняв достовірне подовження латентного періоду входу до темної камери, часу знаходження в освітлених рукавах, кількість відвідувань освітлених та темних рукавів, зменшував тривалість перебування тварин у темних рукавах лабіринту, а також знижував суму показників вегетативного супроводу емоційних реакцій. У той же час, на тлі застосування заявленого засобу в дозі 100 мг/кг відбувалося достовірне подовження часу знаходження тварин в освітлених рукавах, збільшення кількості відвідувань освітлених і темних рукавів лабіринту та центральної площадки, зменшення тривалості перебування мишей в темних рукавах, а також спостерігалась тенденція до подовження латентного періоду входу до темної камери без істотного впливу на вегетативний супровід емоційних реакцій.

Приклад 4

- Беручи до уваги одну з найбільш виразних побічних реакцій більшості транквілізаторів (зокрема діазепаму) - міорелаксацію, було досліджено вплив заявленого засобу на м'язовий тонус та координацію рухів за допомогою тесту "стрижень, що обертається". Для проведення тесту було взято 21 безпородну білу мишу обох статей, яких методом випадкового вибору розділили на 3 групи: тварини, що отримували заявлений засіб у дозі 100 мг/кг (n=7); тварини, що отримували препарат порівняння діазепам у дозі 10 мг/кг (n=7) та контрольну групу (n=7).

- З метою визначення впливу заявленого засобу на м'язовий тонус та координацію рухів використано режим профілактичного введення заявленого засобу. Заявлений засіб у вигляді водного розчину сухого екстракту, а також водний розчин діазепаму в зазначених дозах вводили внутрішньошлунково протягом 2 днів, востаннє за 30 хв до проведення тесту. Мишам групи контролю у такому ж режимі вводили інтрагастрально воду очищену в аналогічному об'ємі (0,1 мл на 10 г маси тіла). Оцінку впливу проводили з урахуванням часу утримання тварин на стандартному стрижні, що обертався з постійною швидкістю 10 обертів за хвилину.

Для оцінки статистичної значущості відмінності результатів використовували кутове перетворення Фішера. Результати дослідження наведені в таблиці 4.

Таблиця 4

Дослідження впливу заявленого засобу на м'язовий тонус та координацію рухів в умовах тесту "стрижень, що обертається"

Група	Впали до 30 с	Впали до 1 хв	Впали до 5 хв
Контроль, n=7	1/14,3 %	4/57,1 %	4/57,1 %
Заявлений засіб, 100мг/кг, n=7	0/0 % [#]	0/0 % ^{*#}	4/57,1 % [#]
Діазепам, 10 мг/кг, n=7	5/71,4 % [*]	5/71,4 %	7/100 % [*]

Примітки:

1. В числівнику абсолютна кількість тварин, у знаменнику, %;
2. * - достовірні відмінності з показником контролю (p<0,01);
3. # - достовірні відмінності з показником групи діазепаму (p<0,01).

5 Аналіз даних таблиці 4 свідчить про відсутність у заявленого засобу негативного впливу на тонус скелетних м'язів та координацію рухів. Навпаки, він достовірно зменшує відсоток мишей, що впали до 1 хвилини, більш ніж на 50 % по відношенню до групи контролю, що свідчить про вибірковість анксиолітичної дії заявленого засобу (анксиоселективність). В той же час на фоні введення діазепаму спостерігається чітка міорелаксація, що проявляється в достовірному збільшенні відсотка мишей, що впали зі стрижня до 30 секунд та 5 хвилин. За відсутністю негативного впливу на м'язовий тонус та координацію рухів заявлений засіб вірогідно перевершував діазепам (табл. 4).

10 Таким чином, заявлено лікувально-профілактичний засіб у формі сухого екстракту рутки Шлейхера з використанням води в якості екстрагенту, який стандартизують за вмістом алкалоїдів групи ізохіноліну та флавоноїдів. Заявлений засіб характеризується вираженою анксиолітичною дією без негативного впливу на тонус скелетних м'язів та координацію рухів. Його застосування сприятиме індивідуалізації фармакотерапії та підвищенню її безпеки. Засіб є зручним у використанні. Засіб одержується з доступної сировини за простим способом, який може бути здійснено в умовах хіміко-фармацевтичних виробництв за допомогою стандартного обладнання.

Джерела інформації:

1. Бурчинський С.Г. Комбіновані засоби фармакотерапії невротичних і неврозоподібних розладів // Укр. мед. часопис - №6 (38). - 2003. - С. 45-48.
- 25 2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. - М.: Новая волна, 2002. - В 2-х т. - Т. 1. - С. 74-87.
3. Державний формуляр лікарських засобів. Випуск четвертий. - К., 2012. - С. 303-308.
4. Лавренова Г.В., Лавренов В.К. Энциклопедия лекарственных растений (в 2-х томах). Том 1. - Д.: Издательство "Донецчина", 1997. - С. 286.
- 30 5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр".-1-е вид. - Харків: РІРЕГ, 2001. - Доповнення 1, 2004. - С. 271-273.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева.-2-изд., перераб. и доп. - М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005. - С. 257-258.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

40 Застосування лікувально-профілактичного засобу у формі сухого екстракту рутки Шлейхера (*Fumaria schleicheri* Soy.-Willem.), одержаного із застосуванням води як екстрагенту, при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10, як агента, що проявляє анксиолітичну дію.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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