



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **138526** (13) **U**
(51) МПК (2019.01)
A61K 36/882 (2006.01)
A61P 29/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2019 06408</p> <p>(22) Дата подання заявки: 10.06.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.11.2019</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.11.2019, Бюл.№ 22</p>	<p>(72) Винахідник(и): Яременко Максим Сергійович (UA), Гонтова Тетяна Миколаївна (UA), Коранг Людмила Анатоліївна (UA), Деримедвідь Людмила Віталіївна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)</p> <p>(74) Представник: Лерантович Еліна Томашівна, реєстр. №285</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ З ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ДІЄЮ

(57) Реферат:

Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу на основі рослинної сировини з протизапальною дією шляхом екстракції рослинної сировини етиловим спиртом в батареї перколяторів. Як рослинну сировину використовують листя айру звичайного з розміром частинок 0,5-1,0 мм. Екстракцію здійснюють водно-спиртовою сумішшю при співвідношенні сировина:екстрагент від 1:5,0 до 1:6,0, при концентрації етанолу 70%, настоювання протягом доби в батареї з 5 перколяторів.

UA 138526 U

Корисна модель належить до хіміко-фармацевтичної галузі, а саме стосується способів одержання біологічно активних речовин з природної сировини, зокрема - способів одержання рідкого екстракту з рослинної сировини, що має протизапальну активність.

5 В даний час приділяється велика увага вивченню, розробці та впровадженню в практику лікарських протизапальних препаратів, оскільки запальні захворювання широко поширені, страждають ними особи різного віку, нерідко ці захворювання супроводжуються важкими клінічними проявами і є причиною часткової або повної втрати працездатності великих контингентів населення.

10 Запалення є частиною складної біологічної відповіді та захисною пристосувальною реакцією організму на дію різних пошкоджуючих факторів: біологічних, фізичних, хімічних як екзогенного так і ендогенного походження.

Незважаючи на те що сучасний арсенал протизапальних лікарських препаратів налічує значну кількість. Це пов'язано з тим, що "ідеальних" ліків не буває і не всі препарати протизапальної дії відповідають високим вимогам ефективності і безпеки.

15 Лікарськими засобами першої лінії для фармакологічної корекції запальних процесів є нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) (Benefits and risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: methodologic limitations lead to clinical uncertainties / M. A. Rane, J. G. Foster, Wood S. K. et al. Ther Innov Regul Sci. 2018. doi: 10.1177/2168479018794159.), але коротко- та/або довгострокові системні побічні ефекти цієї групи препаратів обмежують їх застосування у ряді випадків.

20 Світові та українські тенденції медицини сьогодення свідчать про стрімке зростання інтересу до фітотерапії. В світлі останнього можна стверджувати, що достойною альтернативою фармакотерапії НПЗЗ може бути застосування препаратів рослинного походження, які здатні впливати на різні ланки запального процесу.

25 З засобів рослинного походження найбільш часто застосовують препарати, які мають протизапальну дію, на основі біологічно активних речовин, що не мають протипоказань і побічних ефектів.

Відомий фітопрепарат, який використовується у вигляді 40 % спиртової настоянки і містить квітки ромашки, коріння комірника, родовика, перстачу, оману і змійовика, елеутерокок, плоди глоду і шипшини, лист подорожника і мати-й-мачухи і насіння кропу при певному співвідношенні компонентів (Пат. РФ № 2177796).

Відомі засоби, які мають протизапальну, антиоксидантну дію, на основі водних очищених концентрованих екстрактів з листя персика і рослини очанки (Пат. РФ № 2308961), спиртової настоянки меліси і фенілпропанодів (Пат. РФ № 2275931).

35 Відомий спосіб отримання засобу (пат. РФ 2171680), що має протизапальною активністю з листя лопуха повстяного.

Відомий спосіб отримання засобу (пат. РФ 2376025, А61К 36/185, А61Р 31/00, опубл. 20.12.2009 Бюл. № 35), що включає сушіння листя і стебел кропиви до залишкової вологості 4-6 мас. %, подрібнення до розмірів 50-90 нм в кульових млинах планетарного, вібраційного, вібровідцентрового, роликового типів, що забезпечують прискорення тіл, що мелють, наприклад куль, до 400 м/с² в середовищі аргону або азоту.

Відомий спосіб одержання лікувально-профілактичного гіпоглікемічного засобу з листя кизилу (Компендиум 2008 - лекарственные препараты /Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. - К.: Морион, 2008. - 2270, с. 1), що полягає у послідовній екстракції 50 % етанолом, а потім водою, очищеною листям кизилу, подрібненого до розміру часток 1,0-2,0 мм, з додатковим очищенням водної витяжки і подальшим об'єднанням екстрактів і упарюванням досуха. Одержаний спиртово-водний екстракт являє собою сухий порошок світло-коричневого кольору зі слабким специфічним запахом.

Недоліками цього способу є використання нефармакопейної, нестандартизованої сировини. Оскільки засіб не стерилізують, то при зберіганні та використанні можуть виникати проблеми з мікробною забрудненістю лікарського засобу. При одержанні екстракту використовують два розчинники - етанол та воду, які мають різну полярність, тому й можуть виникнути проблеми з розчинністю екстракту та однорідністю його лікарських форм.

Відомий спосіб отримання рідких екстрактів з рослинної сировини, що полягає в екстракції рослинного матеріалу в батареї перколяторів (дифузоров) (Інструкція по приготуванню рідких екстрактів методом реперколяції по варіації Н.А. Чулкова // Тр.-центр. Науково-досл. Аптечної лабораторії. Науково-практична інформація. - М., 1943. - № 2. - С. 9-12.). Однак відсутні конкретні критерії проведення екстракції для рослинної сировини листя айру звичайного, вивчення властивостей екстракту якого становить значний інтерес.

На сьогоднішній день відсутній найбільш оптимальний по режиму спосіб отримання рідкого екстракту з листя аїру звичайного.

В основу корисної моделі поставлена задача розширення арсеналу способів отримання екстрактів з рослинної сировини, які мають біологічну активність, а саме для фармакокорекції запальних процесів, наряду з підвищенням їх безпечності.

Поставлена задача вирішується новим способом отримання лікувально-профілактичного засобу на основі рослинної сировини з протизапальною дією, що полягає в екстракції рослинної сировини етиловим спиртом в батареї перколяторів, згідно з корисною моделлю, як рослинну сировину використовують листя аїру звичайного з розміром частинок 0,5-1,0 мм, екстракцію здійснюють водно-спиртовою сумішшю при співвідношенні сировина екстрагент 1:5,0-1:6,0, при концентрації етанолу 70 % настоювання протягом доби в батареї з 5 перколяторів.

Спосіб здійснюють наступним чином (на прикладі батареї з 5 перколяторів).

Заявлений спосіб одержання спиртово-водного екстракту листя аїру звичайного здійснюється методом реперколяції. Екстрагування проводять у батареї з п'яти перколяторів. У перший перколятор завантажують п'яту частину свіжоподрібною та просіяною сировини, після чого заливають рівною кількістю чистого екстрагенту (для першого перколятора) або витяжкою, отриманою із попереднього перколятора (для другого і всіх наступних перколяторів). Набухлу сировину завантажують у перший перколятор, заливають екстрагентом до "дзеркала" і залишають на добу. Наступного дня з першого перколятора зливають витяжки в два прийоми: першу витяжку (в об'ємі, рівному масі сировини, завантаженої в перколятор) використовують для замочування сировини в другому перколяторі, і другу витяжку (у подвійному об'ємі стосовно маси сировини), що використовують для настоювання сировини в другому перколяторі. У цей час у перший перколятор подають свіжий екстрагент у кількості, рівній сумі витяжок. На третій день із другого перколятора збирають також дві витяжки: для роботи із сировиною, призначеною для завантаження в третій перколятор. У другий перколятор подають витяжки з першого перколятора, а в нього знову подають свіжий екстрагент. Далі процес проводиться аналогічно. Через добу після завантаження останнього перколятора починається робочий період. У цей час з п'ятого перколятора зливають першу порцію готового продукту в об'ємі, рівному масі сировини в цьому перколяторі. Дана витяжка зберігається в холодильнику. Одночасно з першого перколятора зливають усі витяжки і подають їх у другий перколятор. Сировина в першому перколяторі повністю виснажена. Свіжий екстрагент подають у другий перколятор. При отриманні п'ятох витяжок з п'ятого перколятора в об'ємі, рівному масі сировини в ньому, вони об'єднуються.

Одержаний рідкий екстракт з листя аїру звичайного - це в'язкувата темно-коричнева рідина, з вираженим характерним запахом та пекучо-гірким смаком.

Протизапальна дія рідкого спиртово-водного екстракту листя аїру звичайного (екстрагент спирт етиловий 70 %) за джерелами наукової літератури не відома. Авторами вперше була встановлена протизапальна дія рідкого 70 % спиртово-водного екстракту листя аїру звичайного.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1. Протизапальну активність рідкого спиртово-водного екстракту листя аїру звичайного (екстрагент спирт етиловий 70 %) оцінювали за умов карагенінового набряку лап у щурів. Тобто, індукований карагеніном набряк лапи щурів використовували як модель запалення.

Тварини були розділені на групи по 6 щурів: I - контрольна патологія (тварини, яким вводили розчин карагеніну та які отримували дистильовану воду); II - тварини, яким вводили розчин карагеніну та досліджуваний РСВЕЛА у дозі 0,5 мл/кг; щури III та IV групи на тлі введення карагеніну отримували препарати порівняння: диклофенак натрію (капс. по 25 мг виробництва ТОВ "Харківське фармацевтичне підприємство "Здоров'я народу" Україна) у дозі 8 мг/кг та кверцетин у дозі 11 мг/кг (гран. по 2 г виробництва НВЦ "БХФЗ") відповідно.

Карагеніновий набряк відтворювали шляхом субплантарного введенням 0,1 мл 1 % карагеніну ("Fluka", Швейцарія) в праву задню лапу щурів. Набряк сприймався як ознака запалення, за розвитком якого спостерігали в динаміці через 30; 60; 90; 120; 180 та 240 хв, а також через 24 години, для чого вимірювали об'єм лап в см³ за допомогою цифрового плетизмометра Panlab (Іспанія) моделі LE 7500 версії V29/10/2014.

Досліджуваний екстракт та препарати порівняння застосовували в лікувально-профілактичному режимі: внутрішньошлунково одноразово щоденно протягом 5 діб до моделювання запалення, останній раз за 1 годину до ін'єкції карагеніну. РСВЕЛА в досліджуваній дозі 0,5 мл/кг для зручності дозування попередньо розводили водою та вводили із розрахунку 0,5 мл на 100 г щура. Вибір диклофенаку натрію, як препарату порівняння був обумовлений тим, що це є класичний протизапальний засіб неселективного впливу, основним

механізмом дії якого є гальмування біосинтезу простагландинів, що обумовлено його антициклооксигеназною активністю. Тоді як для кверцетину (флавоноїд флавонового класу) домінуючим механізмом протизапальної активності є інгібування 5-ліпооксигенази (антилейкотриєнова дія). Окрім цього встановлено, що кверцетин чинить пряму пригнічуючу дію на секрецію гістаміну, функціональну активність алоантигенспецифічних цитотоксичних Т-лімфоцитів, інтерлейкіну 8 (ІЛ-8), фактора некрозу пухлин α (ФНП- α).

Протизапальний ефект досліджуваного екстракту та препаратів порівняння розраховували за формулою:

$$ПЗА = (V_{кп} - V_{д}) / V_{кп} \cdot 100 (\%)$$

де, ПЗА - протизапальна активність, %;

$V_{кп}$ (см³) - медіанна об'єму стопи у тварин з групи контрольної патології;

$V_{д}$ (см³) - медіанна об'єму стопи у групі тварин, які отримували досліджувані засоби.

Отриманий масив даних обробляли методами варіаційної статистики (медіана, верхній та нижній квартилі) з використанням непараметричних методів аналізу (критерій Крускала-Уолліса, Манна-Вітні). Прийнятий рівень значущості $p < 0,05$. Для отримання статистичних висновків використовували стандартний пакет програм Statistica.

Аналіз даних табл. 1 свідчить, що РСВЕЛА виявляє протизапальну дію на рівні 10,0-79,5 %, за якою не поступається препаратам порівняння диклофенаку натрію (28,7-80,1 %) та кверцетину (4,6-80,1 %) протягом всього періоду дослідження. Антиексудативна активність РСВЕЛА на піку запалення становила 68,9 % ($p < 0,05$) на 120 та 79,5 % ($p < 0,05$) на 180 хв.

Пригнічення розвитку набряку під впливом РСВЕЛА на 120 хв (2 год.) карагенін-індукованого запалення ймовірно обумовлена інгібуванням медіаторів ранньої фази запального процесу, таких як гістамін, 5-гідрокситриптамін та брадикінін, тоді як антиексудативна дія екстракту на 180 хв (3 год.) пов'язана з пригніченням під його впливом синтезу простагландинів, вільних радикалів та інгібуванням циклооксигенази-2 (ЦОГ-2).

Таблиця 1

Дослідження протизапальних властивостей рідкого 70 % спиртово-водного екстракту з листків айру звичайного на моделі карагенінового набряку ($n=6$, Median (Q_{25} ; Q_{75}))

Досліджувані групи	$V_{30 \text{ хв}} - V_{вих}$	ПЗА, %	$V_{60 \text{ хв}} - V_{вих}$	ПЗА, %	$V_{120 \text{ хв}} - V_{вих}$	ПЗА, %	$V_{180 \text{ хв}} - V_{вих}$	ПЗА, %	$V_{240 \text{ хв}} - V_{вих}$	ПЗА, %	$V_{24,0 \text{ год.}} - V_{вих}$	ПЗА, %
Карагенін 1 % - 0,1 мл	0,30 (0,26; 0,37)	-	0,45 (0,41; 0,59)	-	0,90 (0,59; 0,95)	-	1,51 (1,4; 1,55)	-	0,87 (0,84; 1,32)	-	1,70 (1,63; 1,83)	-
Карагенін 1 % - 0,1 мл + РСВЕЛА (70 %), 0,5 мл/кг	0,27 (0,19; 0,39)	10,0	0,39 (0,26; 0,70)	13,3	0,28* (0,20; 0,52)	68,9	0,30* (0,06; 0,48)	79,5	0,47* (0,38; 0,59)	46,0	0,74* (0,53; 0,81)	56,5
Карагенін 1 % - 0,1 мл + Диклофенак натрію, 8 мг/кг	0,17 (0,14; 0,31)	43,3	0,31 (0,17; 0,47)	31,1	0,19* (0,17; 0,32)	78,9	0,30* (0,30; 0,46)	80,1	0,62* (0,52; 0,66)	28,7	0,95* (0,89; 1,12)	44,1
Карагенін 1 % - 0,1 мл + Кверцетин, 11 мг/кг	0,14* (0,05; 0,15)	53,3	0,16* (0,15; 0,28)	64,4	0,28* (0,21; 0,37)	68,9	0,31* (0,00; 0,44)	80,1	0,83 (0,20; 1,07)	4,6	0,81 (0,74; 0,89)	52,3

Примітки:

* - достовірно відносно контрольної патології, $p < 0,05$;

- достовірно відносно кверцетину, $p < 0,05$;

РСВЕЛА (70 %) - рідкий спиртово-водний екстракт листків айру (екстрагент спирт 70 %).

Приклад 2. Вплив РСВЕЛА на розвиток набряку за умов гістамінового ("Sigma-Aldrich", США) запалення лапи у щурів.

Тварини були розділені на групи по 6 щурів у кожній: I - контрольна патологія (тварини з гістаміновим набряком, які отримували дистильовану воду); II - щури з гістаміновим набряком, яким вводили досліджуваний РСВЕЛА (70 %) в дозі 0,5 мл/кг; III, IV та V групи - тварини з гістаміновим набряком, які отримували препарати порівняння: диклофенак натрію (капс. по 25 мг виробництва ТОВ "Харківське фармацевтичне підприємство "Здоров'я народу" Україна) дозою 8 мг/кг, кверцетин у дозі 11 мг/кг (гран. по 2 г виробництва НВЦ "БХФЗ") та класичний антигістамінний препарат лоратадин дозою 1 мг/кг (таб. Лоратадин-Дарниця по 10 мг виробництва ПАТ ФФ "Дарниця") відповідно.

Досліджуваний екстракт та препарати порівняння вводили внутрішньо-шлунково у лікувально-профілактичному режимі (1 раз на добу протягом 5 діб та на 6 добу за 1 год. до ін'єкції 0,1 % розчину гістаміну субплантарно у задню стопу щура в об'ємі 0,1 мл). За розвитком набряку спостерігали в динаміці через 30, 60 та 90 хв, для чого вимірювали об'єм лап в см³ за допомогою цифрового плетизмометра Panlab (Іспанія) моделі LE 7500 версії V29/10/2014.

Протизапальний ефект РСВЕЛА та препаратів порівняння розраховували за формулою:

$$ПЗА = (V_{кп} - V_{д}) / V_{кп} \cdot 100 (\%)$$

де, ПЗА - протизапальна активність, %;

$V_{кп}$ (см³) - медіанна об'єму стопи у тварин з групи контрольної патології;

$V_{д}$ (см³) - медіанна об'єму стопи у групі тварин, які отримували досліджувані засоби.

Таблиця 2

Дослідження протизапальних властивостей рідкого 70 % спиртово-водного екстракту з листків аїру на моделі гістамінового набряку (n=6, Median (Q₂₅; Q₇₅))

Умови досліджу	$V_{30 \text{ хв}} - V_{\text{вих}}$	ПЗА, %	$V_{60 \text{ хв}} - V_{\text{вих}}$	ПЗА, %	$V_{90 \text{ хв}} - V_{\text{вих}}$	ПЗА, %
Гістамін, 0,1 % - 0,1 мл	1,20 (1,13; 1,27)	-	0,65 (0,49; 0,77)	-	0,48 (0,26; 0,51)	-
Гістамін, 0,1 % - 0,1 мл + РСВЕЛА (70 %), 0,5 мл/кг	0,59* (0,47; 0,72)	50,8	0,47* (0,30; 0,49)	27,7	0,24* (0,20; 0,32)	50,0
Гістамін, 0,1 % - 0,1 мл + Диклофенак натрію, 8 мг/кг	0,72* (0,31; 0,71)	40,0	0,44* (0,33; 0,57)	32,3	0,37 (0,33; 0,42)	22,9
Гістамін, 0,1 % - 0,1 мл + Лоратадин, 1 мг/кг	0,38* (0,24; 0,51)	68,3	0,30* (0,24; 0,31)	58,3	0,13* (0,03; 0,20)	72,9
Гістамін, 0,1 % - 0,1 мл + Кверцетин, 11 мг/кг	0,34* (0,27; 0,49)	71,7	0,35* (0,12; 0,48)	46,1	0,17* (0,11; 0,23)	64,6

Примітки:

* - достовірно відносно контрольної патології;

РСВЕЛА (70 %) - рідкий спиртово-водний екстракт з листків аїру (екстрагент спирт 70 %).

Отриманий масив даних обробляли методами варіаційної статистики (медіана, верхній та нижній квартилі) з використанням непараметричних методів аналізу (критерій Крускала-Уолліса, Манна-Вітні). Прийнятий рівень значущості $p < 0,05$. Для отримання статистичних висновків використовували стандартний пакет програм Statistica (версія 6).

Результати дослідження наведені у таблиці 2.

Аналіз даних табл. 2 свідчить, що РСВЕЛА за умов гістамін-індукованого набряку виявляє протизапальну дію на рівні 50,8; 27,7 та 50,0 % відповідно на 30; 60 та 90 хв набряку. За виразністю протизапальної активності РСВЕЛА не поступається всі трьом препаратам порівняння: диклофенаку натрію, кверцетину та лоратадину, що вказує на здатність досліджуваного екстракту чинити гальмівний вплив на медіатори ранньої фази запального процесу: в основному біогенні аміни (гістамін).

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать, що РСВЕЛА виявляє виражену протизапальну дію з полівалентним механізмом реалізації: гальмівним впливом на медіатори ранньої фази запального процесу, ПГ, процеси ПОЛ, стабілізацію клітинних і субклітинних мембран і опосередковане або пряме пригнічення ЦОГ.

Екстракт, отриманий заявленим способом, володіє протизапальною активністю і підвищеною тривалістю термінів зберігання

Таким чином, наведені переваги екстракту листя аїру представляють інтерес для подальших доклінічних та клінічних досліджень з метою створення на його основі нових ефективних фітозасобів для профілактики та фармакокорекції запальних процесів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу на основі рослинної сировини з протизапальною дією шляхом екстракції рослинної сировини етиловим спиртом в батареї перколяторів, який **відрізняється** тим, що як рослинну сировину використовують листя аїру звичайного з розміром частинок 0,5-1,0 мм, екстракцію здійснюють водно-спиртовою сумішшю при співвідношенні сировина:екстрагент від 1:5,0 до 1:6,0, при концентрації етанолу 70 %, настоювання протягом доби в батареї з 5 перколяторів.

15

Комп'ютерна верстка М. Шамонова

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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