



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106088** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)
A61K 36/28 (2006.01)
A61K 135/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
B01D 11/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2012 04507	(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)
(22) Дата подання заявки: 10.04.2012	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.07.2014	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 30879 A, 15.12.2000 UA 84336 C2, 10.10.2008 RU 2018315 C1, 30.08.1994 RU 1510147 C, 30.11.1994 RU 2423991 C2, 20.07.2011 RU 2270686 C2, 27.02.2006 Куров А.А. До питання вибору оптимального екстрагенту для одержання сумарних комплексів біологічно активних речовин трави <i>Galinsoga parviflora</i> Cav. / А.А. Куров, В.М. Ковальов, Т.О. Краснікова, В.І. Зеленець // Актуальні питання створення нових лікарських засобів: тези доповідей всеукраїнської науково - практичної конференції студентів та молодих вчених (21-22 квітня 2011 р.). – Х.: вид-во НФаУ, 2011. – С. 81
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.10.2013, Бюл.№ 19	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2014, Бюл.№ 14	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОЛІФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ З ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЮ АКТИВНІСТЮ З ГАЛІНСОГИ ДРІБНОКВІТКОВОЇ**(57) Реферат:**

Винахід 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. Спосіб здійснюють шляхом екстракції трави галінсоги дрібноквіткової (*Galinsoga parviflora* Cav.) 10-кратною кількістю 69-71 % етанолу протягом 12-13 годин, одержаний екстракт концентрують до 1/20 початкового об'єму, очищують хлороформом при співвідношенні водного залишку і хлороформу як 1:1 та висушують.

UA 106088 C2

Винахід 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.

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 ґенезу 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].

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 метилом при співвідношенні водний залишок: хлористий метилен 3:4 з подальшим сушінням до сухого залишку.

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.

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.

Задачею винаходу 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.

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 винаходом, 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 і хлороформу як 1:1.

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

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.

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 і 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.

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 °C 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 %.

Винахід ілюструється прикладами.

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 °C 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. 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 внутрішньошлунково мишам у вигляді 50 % олійного розчину в дозі 10 мл/кг одноразово. За препарат порівняння вибрано Силібор.

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:

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

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 органа і маси тіла тварин) [3]. Результати дослідження наведені в таблиці.

Таблиця

Дослідження гепатопротекторної активності поліфенольного комплексу з трави галінсоги дрібнокріткової 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).

Введення тетрахлорметану супроводжувалося зростанням активності маркерного ферменту цитолізу АлАТ у плазмі крові майже в 4 рази. Поліфенольний комплекс галінсоги дрібнокріткової достовірно знижував цей показник та виявився однаково ефективним в усіх використаних дозах. 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 дрібнокріткової попереджує цитоліз гепатоцитів та знижує запальні процеси в печінці, що свідчить про його гепатопротекторні властивості.

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

Таким чином, поліфенольний комплекс із трави галінсоги дрібнокріткової, 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.

Заявлений спосіб є економічно доцільним і простим у виконанні.

Джерела інформації:

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

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.

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.

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.

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

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 і хлороформу як 1:1.

15

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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