



УКРАЇНА

(19) UA (11) 19547 (13) U
(51) МПК (2006)
A61K 36/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ФІТОСУБСТАНЦІЇ З ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ДІЄЮ

1

2

(21) u200607435

(22) 04.07.2006

(24) 15.12.2006

(46) 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.

(72) Дубровна Людмила Володимирівна, Бензель
Леонід Васильович, Вовк Юрій Володимирович,
Нектегаєв Ігор Олексійович, Бензель Ігор Леонідо-
вич, Маслюк Марія Володимирівна

(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

(57) Спосіб одержання фітосубстанції з протиза-
пальною дією, що включає використання сухої
рослинної сировини з плодів перцю стручкового
(*Capsicum annuum*), її подрібнення, який **відрізня-**
ється тим, що подрібнену суху рослинну сировину
кілька разів екстрагують при температурі 90-95°C
очищеною водою у співвідношенні 1:15-1:20 впро-
довж 30-60 хвилин з наступним просвітленням,
фільтруванням та ліофільним висушуванням кін-
цевого продукту.

Корисна модель відноситься до галузі меди-
цини, а саме - фармації, і може бути використана
для створення на основі біологічно активних речо-
вин, виділених із плодів перцю стручкового
(*Capsicum annuum*), нового протизапального лікар-
ського засобу при лікуванні стоматологічних хво-
роб.

У медичній практиці застосовують настояку
плодів перцю стручкового. Відомий спосіб одер-
жання такого засобу, основні умови виконання
якого включають настоювання 10г сухої подрібне-
ної сировини у 100мл 70% етанолу з наступним
процідженням настояки [1], що не дозволяє мак-
симально виділити основні діючі речовини з рос-
линної сировини. Одержаний фітопрепарат не
може бути використаний в стоматологічній практи-
ці через подразнюючу дію на слизову оболонку
ротової порожнини і не володіє протизапальними
властивостями, тому має досить обмежений
спектр дії на організм.

Недоліком вказаного способу є також те, що
він не дає можливості отримати водорозчинний
фармацевтичний препарат у вигляді стійкої сухої
субстанції, придатної до застосування в технології
ліків.

В основу корисної моделі поставлено завдан-
ня удосконалення способу одержання рослинного
екстракту з протизапальними властивостями, в
якому шляхом проведення кілька разів екстрагу-
вання забезпечують повноту виділення біологічно
активних речовин та високий вихід готового ліофі-
лизованого продукту.

Вказане завдання вирішується тим, що у спо-
собі отримання фітосубстанції з протизапальною
дією, що включає використання сухої рослинної

сировини з плодів перцю стручкового (*Capsicum
annuum*), її подрібнення, згідно з корисною модел-
лю, подрібнену суху рослинну сировину кілька ра-
зів екстрагують при температурі 90-95°C очище-
ною водою у співвідношенні 1:15-1:20 впродовж
30-60 хвилин, з наступним просвітленням, фільт-
руванням та ліофільним висушуванням кінцевого
продукту.

Розроблений спосіб екстрагування плодів пе-
рцю стручкового дає можливість одержати водо-
розчинну ліофілізовану фітосубстанцію з виходом
біологічно активних речовин у кількості 33,6-38,1%
і стабільністю вираженої протизапальної дії впро-
довж 2-3 років.

Запропонований спосіб здійснюють таким чи-
ном.

Суші плоди перцю стручкового (*Capsicum
annuum*) подрібнюють на частинки розміром 3-5мм,
екстрагують діючі речовини очищеною водою при
температурі 90-95°C у співвідношенні 1:15-1:20
впродовж 30-60 хвилин і проціджують. Екстрагу-
вання проводять 3-4 рази, після чого об'єднані
екстракти просвітлюють впродовж 10-15 годин,
фільтрують і висушують.

Одержаний ліофілізований екстракт є компле-
ксом біологічно активних речовин у вигляді гігрос-
копічного аморфного порошку жовто-коричневого
кольору з легким специфічним запахом і пекучим
смаком. Вихід кінцевого продукту становить 33,6-
38,1%. У ліофілізаті, умовно позначеному «ПС»,
виявлені капсаїциноїди, флавоноїди, сапоніни,
фенолкарбонові кислоти та інші фізіологічно акти-
вні сполуки. Вміст капсаїциноїдів становить 3,7%.

Спосіб ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1. 50г подрібненої сухої лікарської

UA (19) 19547 (13) U

рослинної сировини з плодів перцю стручкового (*Capsicum annuum*) екстрагували в круглодонній колбі ємністю 2,0л доведеною до кипіння очищеною водою у співвідношенні сировина - екстрагент 1:15 на водяній лазні при температурі 90°C впродовж 30 хвилин. Аналогічний спосіб отримання біологічно активних речовин повторювали ще тричі, після чого об'єднані екстракти просвітлювали при температурі 8-10°C впродовж 10 годин і фільтрували. Фільтрати розливали у флакони по 250мл і висушували за допомогою сублімаційного апарату КС-30. Вихід кінцевого продукту становив 33,6%.

Приклад 2. 50г подрібненої сухої лікарської рослинної сировини з плодів перцю стручкового (*Capsicum annuum*) екстрагували в круглодонній колбі ємністю 2,0л доведеною до кипіння очищеною водою у співвідношенні сировина - екстрагент 1:20 на водяній лазні при температурі 93°C впродовж 45 хвилин. Вказане екстрагування повторювали ще двічі, після чого об'єднані екстракти просвітлювали при температурі 8-10°C впродовж 12 годин, фільтрували і проводили ліофільне висушування. Вихід кінцевого продукту становив 35,9%.

Приклад 3. 50г подрібненої сухої лікарської рослинної сировини з плодів перцю стручкового (*Capsicum annuum*) екстрагували в круглодонній колбі ємністю 2,0л доведеною до кипіння очищеною водою у співвідношенні сировина - екстрагент 1:17 на водяній лазні при температурі 95°C впродовж 60 хвилин. Аналогічний спосіб отримання біологічно активних речовин повторювали ще тричі, після чого об'єднані екстракти просвітлювали при температурі 8-10°C впродовж 15 годин, потім фільтрували і ліофільне висушували. Вихід кінцевого продукту становив 38,1%.

Вивчення впливу фітосубстанції з плодів перцю стручкового (*Capsicum annuum*) на перебіг асептичного запалення м'яких тканин ротової порожнини проводили в дослідях на 42 статевозрілих білих щурах-самцях лінії Вістар віком 5-6 місяців і масою 240-350г. Експеримент тривав 8 днів. Для відтворення запалення м'яких тканин ротової порожнини використано «скипидарну» модель асептичного запалення [2]. Дослідження проводились згідно з методичними рекомендаціями та відповідали основним вимогам Державного фармакологічного центру МОЗ України [3, 4].

Для порівняльної характеристики і оцінки активності «ПС» використовували засіб «Ротокан», який застосовували за оптимальною для нього схемою введення: на рясно змочених ватних турундах.

Тварини були поділені на 4 групи: перша група (6 тварин) - інтактні тварини; друга - контрольна (12 тварин) - модель асептичного запалення м'яких тканин ротової порожнини без лікування; третя група - дослідна №1 (12 тварин) - після моделювання асептичного запалення як лікувальний засіб використано «Ротокан»; четверта група - дослідна №2 (12 тварин) - після моделювання асептичного запалення як лікувальний засіб використано 4% водний розчин «ПС».

Запалення м'яких тканин ротової порожнини

відтворювали шляхом введення очищеного скипидару мікрошприцом з фіксованою канюлею та нанесеним на відстані 3мм від кінця голки обмежувачем в перехідну згортку з вестибулярної сторони нижньої щелепи в зоні, яка відповідає розташуванню першого правого моляра. Об'єм введеного скипидару - 0,04мл на 1кг маси тіла. Через тричотири години після введення скипидару з'являлась асиметрія голови тварин за рахунок набряку правої щоки. Праве око щурів частково закривалось. На наступну добу приєдналась сльозотеча з ока, тризм жувальних м'язів, гіперемія слизової оболонки щоки та збільшення набряку.

Методика нанесення «ПС» була наступною: 4% водний розчин фітосубстанції з плодів перцю стручкового наносили на ватну турунду в кількості 0,1-0,25мл та вводили щурам дослідної групи №2 в присінок ротової порожнини з боку запалення на 3-4 хвилини.

Реєстрацію клінічних даних проводили щоденно, починаючи з першого дня дослідів і до зникнення клінічних симптомів запалення у тварин. З великого спектру клінічних симптомів, що характеризують перебіг гострого запального процесу, для оцінки його інтенсивності були обрані і проаналізовані такі ознаки: стан слизової оболонки щоки, наявність набряку, ступінь відкриття рота, стан слизової оболонки ока.

З метою вивчення механізму протизапальної дії фітосубстанції і оцінки ефективності його застосування при асептичному запаленні м'яких тканин ротової порожнини, на 4-й і 8-й день були досліджені клінічні та біохімічні показники крові (лейкоцитарна формула, активність лужної фосфатази нейтрофілів крові та вміст білка в сироватці крові) [5, 6].

Гостра токсичність «ПС» вивчалась на білих мишах-самках, масою 190-200г, які знаходились на звичайному раціоні харчування та при вільному доступі до води. Фітосубстанцію вводили в очередину (д/о) та в шлунок (д/ш) відповідно у дозах від 500 до 4000мг/кг та від 1000 до 6000мг/кг. За тваринами спостерігали протягом 14 днів. Відмічали час загибелі, зміни у поведінці та в зовнішньому вигляді тварин. При д/ш введенні загибель тварин не відмічено, тому за середньосмертельну дозу (LD_{50}) умовно взяли максимально введену дозу 6000мг/кг (IV клас безпеки згідно з ГОСТ 12.1007-76). Як контрольну використовували групу тварин, які отримували еквівалентний об'єм 0,9% розчину натрію хлориду. LD_{50} для білих мишей-самок при д/о визначали за методом Лічфілда і Уїллоксона. LD_{50} =2800мг/кг (V клас безпеки за класифікацією Сідорова К.К.) [7, 8, 9].

Статистична обробка результатів проводилась за допомогою Microsoft Excel. Для оцінки розбіжностей між середніми величинами при нормальному розподілі вибірових сукупностей використовували t-критерій Стюдента. При перевірці гіпотез використовувався рівень значимості $p=0,05$.

Результати проведених досліджень з вивчення динаміки клінічних показників у щурів в умовах моделювання асептичного запалення м'яких тканин ротової порожнини та застосування водного розчину «ПС» наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Динаміка клінічних показників у щурів із асептичним запаленням м'яких тканин ротової порожнини

Клінічні прояви	Група інтактних тварин	Контрольна група	Дослідна група №1	Дослідна група №2
1-й день досліджу				
Ступінь відкриття рота (%)	100,0±0,0	65,61±1,49	70,52±1,0	69,46±1,46
Набряк щоки (мм)	1,00±0,00	1,12±0,02	1,14±0,01	1,15±0,02
Стан слизової оболонки щоки (бал)	0,00±0,00	1,33±0,16	1,30±0,12	1,42±0,34
Стан слизової оболонки ока (бал)	0,00±0,00	7,75±0,20	7,0±0,5	7,33±0,25
2-й день досліджу				
Ступінь відкриття рота (%)	100,0±0,0	67,04±2,17	71,24±2,1	73,92±2,67*
Набряк щоки (мм)	1,00±0,00	1,19±0,02	1,12±0,02	1,13±0,01
Стан слизової оболонки щоки (бал)	0,00±0,00	1,92±0,19	1,58±0,1	1,50±0,16
Стан слизової оболонки ока (бал)	0,00±0,00	7,25±0,14	5,2±0,25	5,83±0,12*
3-й день досліджу				
Ступінь відкриття рота (%)	100,0±0,0	70,02±2,02	75,45±1,9	77,43±2,91*
Набряк щоки (мм)	1,00±0,00	1,18±0,01	1,10±1,01	1,10±0,02*
Стан слизової оболонки щоки (бал)	0,00±0,00	1,92±0,19	1,17±0,12	1,25±0,14*
Стан слизової оболонки ока (бал)	0,00±0,00	7,42±0,16	1,08±1,09	5,00±0,30*
4-й день досліджу				
Ступінь відкриття рота (%)	100,0±0,0	73,92±2,23	77,33±1,12	82,73±2,15*..
Набряк щоки (мм)	1,00±0,00	1,15±0,01	1,1±0,01	1,08±0,01*
Стан слизової оболонки щоки (бал)	0,00±0,00	1,83±0,12	1,08±0,09	0,92±0,16*
Стан слизової оболонки ока (бал)	0,00±0,00	6,00±0,30	4,91±0,28	3,83±0,35*..
5-й день досліджу				
Ступінь відкриття рота (%)	100,0±0,0	76,16±2,34	80,5±1,24	88,23±2,36*..
Набряк щоки (мм)	1,00±0,00	1,12±0,01	1,08±0,01	1,06±0,015*
Стан слизової оболонки щоки (бал)	0,00±0,00	1,58±0,16	1,0±0,19	0,75±0,14*
Стан слизової оболонки ока (бал)	0,00±0,00	5,17±0,30	4,5±0,21	3,17±0,26*..
6-й день досліджу				
Ступінь відкриття рота (%)	100,0±0,0	79,62±2,02	85,16±1,80	93,14±2,42*..
Набряк щоки (мм)	1,00±0,00	1,09±0,01	1,05±0,01	1,03±0,01*
Стан слизової оболонки щоки (бал)	0,00±0,00	1,16±0,12	0,075±0,11	0,50±0,16*
Стан слизової оболонки ока (бал)	0,00±0,00	3,92±0,28	3,08±0,21	2,00±0,30*..
7-й день досліджу				
Ступінь відкриття рота (%)	100,0±0,0	81,81±2,05	87,25±2,10	97,33±1,01*..
Набряк щоки (мм)	1,00±0,00	1,08±0,01	1,05±0,02	1,01±0,01*..
Стан слизової оболонки щоки (бал)	0,00±0,00	1,08±0,16	0,20±0,02	0,16±0,02*
Стан слизової оболонки ока (бал)	0,00±0,00	2,50±0,34	1,58±0,21	0,75±0,14*..
8-й день досліджу				
Ступінь відкриття рота (%)	100,0±0,0	83,32±2,35	88,50±2,9	98,75±1,53*..
Набряк щоки (мм)	1,00±0,00	1,06±0,02	1,03±0,01	1,00±0,00*
Стан слизової оболонки щоки (бал)	0,00±0,00	0,75±0,20	0,00±0,00	0,00±0,00*
Стан слизової оболонки ока (бал)	0,00±0,00	1,66±0,46	1,0±0,28	0,00±0,00*..

Примітка: * - достовірні відмінності ($p<0,05$) від відповідних показників у контрольній групі тварин;.. - достовірні відмінності ($p<0,05$) від відповідних показників у дослідній групі №1.

Дослідження показали, що фітосубстанція з плодів стручкового перцю нормалізує клінічні ознаки запалення. Так, вже з другого дня спостережень ступінь відкриття рота був достовірно більшим у тварин дослідної групи №2 у порівнянні з контрольною. З третього дня експерименту у щурів другої дослідної групи вірогідно зменшувався набряк щоки, підвищувався ступінь відкриття рота і покращувався стан слизової оболонки ока. Позитивна динаміка зменшення клінічних симптомів запалення до останнього дня лікування була прискорена у дослідній групі тварин №2. При співставленні клінічних показників дослідних груп тварин з четвертого дня експерименту виявлено достовірну різницю у ступені відкриття рота та

стані слизової оболонки ока.

У таблиці 2 представлені показники крові у щурів на 4-й та 8-й день дослідження. Клінічні показники крові щурів дослідної групи №2 відрізнялися від аналогічних показників у контрольній групі. На 4-й день експерименту в тварин дослідної групи №2 спостерігався лейкоцитоз, нейтрофілія та моноцитоз, проте їх рівень був достовірно нижчим ніж у контрольній групі щурів. В останній день досліджу (8-й) відмічалась нормалізація всіх показників крові у тварин дослідної групи №2. У тварин, що отримували „Ротокан” спостерігався моноцитоз і нейтрофілія, який був достовірно більш виражений, ніж у дослідній групі №2.

Таблиця 2

Показники крові у щурів на 4-й та 8-й день дослідження

Групи тварин	Лейкоцити	Базофіли		Еозинофіли		Нейтрофіли		Моноцити		Лімфоцити	
	Г/л	Г/л	%	Г/л	%	Г/л	%	Г/л	%	Г/л	%
Група інтактних тварин	11,3±0,77	0,00±0,0	0,00±0,0	0,18±0,11	1,59±0,34	2,53±0,17	22,4±0,24	0,46±0,05	4,09±0,01	8,13±0,45	71,92±1,7
4-й день дослідження											
Контрольна група	20,2±0,40	0,033±0,01	0,67±0,20	0,10±0,019	0,50±0,03	7,70±0,14	38,16±0,58	1,58±0,035	7,84±0,60	10,67±0,25	52,83±0,51
Дослідна група №1	16,0±0,24	0,080±0,01	0,50±0,25	0,19±0,020	1,20±0,12	5,28±0,12	33,0±0,89	1,20±0,041	7,5±0,45	9,25±0,20	57,80±0,89
Дослідна група №2	16,6±0,30*	0,023±0,02**	0,50±0,34*	0,17±0,014**	1,0±0,12*	4,98±0,16**	30,0±1,15**	1,18±0,026*	7,1±0,63*	10,19±0,15**	61,4±0,58**
8-й день дослідження											
Контрольна група	15,1±0,77	0,095±0,01	0,63±0,17	0,17±0,025	1,10±0,30	4,13±0,53	27,33±0,46	0,89±0,047	5,87±0,26	9,82±0,63	65,07±1,55
Дослідна група №1	12,0±0,70	0,030±0,012	0,25±0,01	0,22±0,020	1,83±0,25	2,80±0,12	23,33±0,23	0,63±0,01	5,25±0,54	8,32±0,21	69,34±1,1
Дослідна група №2	11,5±0,25*	0,029±0,01*	0,25±0,10*	0,22±0,017*	1,90±0,31*	2,55±0,32*	22,16±1,18**	0,54±0,01**	4,7±0,77**	8,16±0,16*	70,99±0,57**

Примітка: * - достовірні відмінності ($p < 0,05$) від відповідних показників у контрольній групі тварин;.. - достовірні відмінності ($p < 0,05$) від відповідних показників у дослідній групі тварин №1.

Розвиток запальних процесів м'яких тканин щелепно-лицевої ділянки супроводжується зміною біохімічних маркерів запалення в крові. В таблиці 3 відображені результати дослідження активності лужної фосфатази нейтрофілів лейкоцитів крові в умовах асептичного запалення м'яких тканин ротової порожнини. На 4-й та 8-й день експерименту

даний показник у дослідній групі №2 достовірно відрізнявся від аналогічного показника у контрольній групі тварин. Активність лужної фосфатази нейтрофілів крові у тварин, що отримували засіб „Ротокан” на 8-й день дослідження була в 2,5 рази вищою, ніж у дослідній групі №2.

Таблиця 3

Активність лужної фосфатази нейтрофілів крові щурів (мкмоль/с.л)

Групи тварин	Група інтактних тварин	Контрольна група	Дослідна група №1	Дослідна група №2
4-й день дослідження	0,9±2,29	7,53±0,24	5,50±0,18	4,87±0,43*
8-й день дослідження	0,9±2,29	4,87±0,27	2,83±0,18	1,07±0,17**

Примітка: * - достовірні відмінності ($p < 0,05$) від відповідних показників у контрольній групі тварин;.. - достовірні відмінності ($p < 0,05$) від відповідних показників у дослідній групі №1.

В таблиці 4 представлена динаміка зміни рівня білка в сироватці крові щурів. Як видно, при дослідженні через 4 дні після відтворення асептичного запалення м'яких тканин у сироватці крові контрольних щурів відмічається зниження концентрації білка. Це зумовлено інтенсифікацією катаболічних процесів і втратою білка організмом, що пов'язано з загальною реакцією на запалення. Застосування

фітосубстанції „ПС” гальмувало зниження цього показника. При дослідженні на 8-й день експерименту вміст білка в сироватці крові дослідної групи №2 відповідав показникам інтактних тварин. Вживання „Ротокану” також гальмувало втрату білка організмом, проте у меншій мірі, ніж при застосуванні „ПС”.

Таблиця 4

Рівень білка в сироватці крові щурів (г/л)

Групи тварин	Група інтактних тварин	Контрольна група	Дослідна група №1	Дослідна група №2
4-й день дослідження	102,8±8,5	62,83±1,76	80,66±1,97	86,50±2,86**
8-й день дослідження	102,8±8,5	76,83±1,05	92,50±1,25	99,17±1,13**

Примітка: * - достовірні відмінності ($p < 0,05$) від відповідних показників у контрольній групі тварин;** - достовірні відмінності ($p < 0,05$) від відповідних показників у дослідній групі №1.

Таким чином, зіставивши показники біохімічних маркерів запалення у тварин контрольної та дослідної групи №2, можна стверджувати, що застосування фітосубстанції з плодів перцю стручкового (*Capsicum annuum*) „ПС” позитивно впливає на перебіг асептичного запалення. При цьому, використання засобу „Ротокан” у меншій мірі нормалізує клінічні та біохімічні показники крові щурів при запальному процесі м'яких тканин зубо-щелепової системи.

При порівняльному аналізі результатів лікування встановлено, що найбільш виражена і стійка стабілізація запального процесу в м'яких тканинах відмічається при використанні фітосубстанції з плодів перцю стручкового. Проведене експериментальне дослідження засвідчило, що застосування фітосубстанції з плодів перцю стручкового (*Capsicum annuum*) ліквідовує клінічні ознаки запалення і нормалізує клінічні та біохімічні показники крові у щурів при асептичному запаленні м'яких тканин ротової порожнини. Отримані результати вказують на можливість розробки нової лікарської форми з метою підвищення ефективності лікування запальних процесів м'яких тканин зубо-щелепової системи щелепно-лицевої ділянки.

Джерела інформації:

1. Чекман І.С. Клінічна фітотерапія. - К: А. С. К., 2003. - С.78-79.

2. Борисенко А.Н., Давиденко И.И. Модель асептического воспаления мягких тканей полости рта у крыс. // Стоматология. - 1973. - №5. - С.73-74.

3. Доклінічне вивчення засобів для лікування та профілактики захворювань слизової оболонки порожнини рота. Методичні рекомендації /Косенко К.М., Скиба В.Я., Левицький А. П., Скиба О.І., Дзяд О.В. - К: ДФЦ МОЗ України, 2002. - 19с.

4. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації /Під ред. Стефанова О.В. - К: Авіцена, 2001. - 528с.

5. Горячковский А.М. Справочное пособие по клинической биохимии. - Одесса: ОКФА, 1994. - С.180.

6. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник. /Под ред. Меншикова В.В.- М.: Медицина, 1987. - С.122-125, 174-175.

7. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М. Экспресс-метод определения эффективной дозы и ее ошибки //Фармакология и токсикология. - 1978, - №4. - С.497-502.

8. Litchfield I. T., Wilcoxon T. I. A simplified method of evaluating dose-effect experiments //J. Pharmacol. Exp. Ther., 1949, V.96, P. 99-115.

9. Сидоров К.К. Токсикология новых промышленных веществ. - М: Медицина, 1973. - Вып.3. - 47с.