



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **54663** (13) **U**
(51) **МПК (2009)**
A61K 36/00
A61P 29/00
A61P 9/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ, ЗНЕБОЛЮЮЧОЮ ТА ГІПОТЕНЗИВНОЮ ДІЄЮ

1

2

(21) u201003407

(22) 24.03.2010

(24) 25.11.2010

(46) 25.11.2010, Бюл.№ 22, 2010 р.

(72) КОВАЛЬОВ СЕРГІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ, ДУ-
ЧЕНКО МАРИНА АНАТОЛІЇВНА, ДЕМЕШКО ОЛЬ-
ГА ВОЛОДИМИРІВНА, КОВАЛЬОВ ВОЛОДИМИР
МИКОЛАЙОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб одержання комплексу біологічно акти-
вних речовин з протизапальною, знеболюючою та

гіпотензивною дією шляхом принаймні трикратної екстракції подрібненої рослинної сировини водою при температурі 90-100°C з подальшим об'єднанням відфільтрованих екстрактів, їх упарюванням та сушінням, який **відрізняється** тим, що як рослинну сировину використовують листя гледичії звичайної (*Gleditsia triacanthos* L.), першу екстракцію здійснюють при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10, а наступні екстракції - при співвідношенні 1:9, причому тривалість кожного етапу екстракції дорівнює 1,5 години.

Корисна модель відноситься до фармації, а саме до способів одержання комплексів біологічно активних речовин з рослинної сировини з подальшим їх використанням в якості лікарських субстанцій при створенні препаратів у різних лікарських формах.

Сучасний арсенал лікарських засобів з протизапальною, знеболюючою та гіпотензивною дією представлений, насамперед, засобами синтетичного походження, які здебільшого мають негативну побічну дію. Альтернативним рішенням є створення конкурентоспроможних лікарських засобів рослинного походження з практичною відсутністю негативних побічних ефектів.

Відомий спосіб отримання комплексу біологічно активних речовин у формі сухого екстракту з противиразковою, протизапальною та мембраностабілізуючою дією [1] шляхом триразової екстракції листя ліщини звичайної або грабу звичайного, або їх суміші водою при температурі 50-60°C при співвідношенні сировини до екстрагента (1:10)-(1:15) протягом 4-5 годин. Вихід готового продукту 14,0%.

Проте зазначений спосіб не забезпечує одержання засобу з додатковою комплексною знеболюючою та гіпотензивною дією.

Відомий також спосіб одержання біологічно активних речовин з протизапальною та анаболіч-

ною дією [2] шляхом екстракції подрібненого листа евкаліпту або його шроту евкаліпта після виділення гідрофобної фракції при температурі 90-100°C при співвідношенні сировина:екстрагент 1:3-1:9 протягом 2 годин з подальшим настоюванням 11-12 годин, фільтрацією, упарюванням фільтрату до 1/20-1/22 попереднього об'єму, відстоюванням у холодильнику, відокремлюванням і стерилізацією надосадової рідини та її упарюванням до сухого стану. Вихід готового продукту 8-12%.

Наведений спосіб відзначається тривалістю та багатостадійністю і також не забезпечує одержання засобу, який поєднує протизапальну дію зі знеболюючою та гіпотензивною.

Відомий також спосіб одержання комплексу полісахаридів гемостатичної та протизапальної дії [3], який передбачає принаймні двократну екстракцію листя акації білої водою при температурі 90°C при співвідношенні сировина:екстрагент 1:14-15 протягом 2-3 годин. Одержані зливи об'єднують, упарюють до 1/15 попереднього об'єму, осаджують трикратною кількістю спирту етилового, осад відокремлюють, промивають спиртом етиловим, сушать і подрібнюють. Вихід готового продукту 5,5-7,0%.

До недоліків відомого способу можна віднести його трудомісткість та додаткові витрати спирту етилового. Спосіб також не дозволяє одержати

(13) **U**
(11) **54663**
(19) **UA**

засіб з комплексною знеболюючою та гіпотензивною дією у поєднанні з протизапальною дією.

Завданням корисної моделі є створення способу одержання комплексу біологічно активних речовин шляхом екстрагування листя гледичії звичайної гарячою водою при заданих параметрах способу, в результаті чого одержують біологічно активну субстанцію у формі сухого екстракту з протизапальною, знеболюючою та гіпотензивною дією, яка може бути використана як діюча речовина у складі лікарських засобів, виконаних у різних лікарських формах і придатних до тривалого застосування внаслідок м'якої дії, практичної нетоксичності і відсутності побічних ефектів, притаманних засобам рослинного походження.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі одержання комплексу біологічно активних речовин з протизапальною, знеболюючою та гіпотензивною дією шляхом принаймні трикратної екстракції подрібненої рослинної сировини водою при температурі 90-100°C з подальшим об'єднанням відфільтрованих екстрактів, їх упарюванням та сушкою, згідно з корисною моделлю передбачено, що в якості рослинної сировини використовують листя гледичії звичайної (*Gleditsia*

triacanthos L.), першу екстракцію здійснюють при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10, а наступні екстракції - при співвідношенні 1:9 при тривалості кожного етапу екстракції 1,5 години.

Заявлений спосіб передбачає використання в якості рослинної сировини листя гледичії звичайної [4], що мають переважно спазмолітичну дію. Фармакологічна активність рослини визначається вмістом алкалоїду тріакантину у її листі. Спазмолітична дія тріакантину подібна до ефекту папаверину, але у 4-5 разів менш токсична. Існують дані про жовчогінну та гіпотензивну дію тріакантину. Проте його знеболююча дія невідома з джерел інформації.

Вибір екстрагенту та параметрів заявленого способу здійснено експериментальним шляхом з урахуванням ступеня біологічної активності одержаних комплексів, ефективності, доступності та нешкідливості реактивів, практичного відтворення способу у промислових умовах.

Експериментально встановлено, що використання в якості екстрагента гарячої води при одержанні комплексу біологічно активних речовин (БАР) з листя гледичії забезпечує їх найбільш повну екстракцію (табл.1).

Таблиця 1

Вибір екстрагента за кількісним виходом екстрактивних речовин

Екстрагент	Вода, 90°C	30% етанол	50% етанол	70% етанол	96% етанол
Кількісний вихід екстрактивних речовин, %	38,80	34,76	27,39	28,14	24,64

Передбачене заявленим способом підвищення температури води до 90-100°C і трикратна екстракція сировини новими порціями екстрагенту інтенсифікує процес екстрагування, що дозволяє максимально вилучити БАР з сировини. Крім того, такий екстрагент також вигідний з боку технологічних вимог до здійснення способу, бо є доступним, дешевим та екологічно безпечним.

Сумарне співвідношення сировини до екстрагента 1:28 знайдено експериментально і є оптимальним для вибраної сировини.

На першому етапі екстракції співвідношення сировина:екстрагент становить 1:10 (враховується поглинання частини екстрагента сировиною), а на другому і третьому - 1:9. Менша кількість екстрагента на кожному з етапів не дозволяє ефективно провести екстракцію і створює труднощі технологічного характеру. Більша кількість екстрагента є нераціональною, тому що необхідна екстракція досягається заявленою кількістю екстрагента.

Тривалість кожного з етапів екстракцій 1,5 години є необхідною і достатньою для вичерпного вилучення з сировини комплексу біологічно активних сполук з протизапальною, знеболюючою та гіпотензивною дією.

Заявлений спосіб виключає обробку екстракту спиртом етиловим, яка призводить до зменшення біологічної активності цільового продукту.

В результаті здійснення заявленого способу одержують комплекс БАР - порошок світло-коричневого кольору зі специфічним запахом, гір-

кувато-кислий на смак, добре розчинний у воді, практично не розчинний в ефірі, хлороформі.

Таким чином, використання листя гледичії при сукупності параметрів заявленого способу дозволяє одержати комплекс біологічно активних сполук, який має протизапальну, знеболюючу та гіпотензивну дію.

Заявлений спосіб є новим, невідомим з джерел інформації.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином. Зібране у період з червня по вересень висушене і подрібнене до часток 2-5мм листя гледичії завантажують у реактор з мішалкою і паровою сорочкою, заливають гарячою водою 90°C у співвідношенні сировина:екстрагент 1:10. Екстракцію проводять протягом 1,5 годин при перемішуванні і постійно витриманій температурі 90°C. Процедуру повторюють ще двічі при відношенні сировини до екстрагенту 1:9. Відфільтровані водні витяги об'єднують і упарюють на вакуумно-випарувальному апараті до повного висушування. Сухий екстракт подрібнюють. Вихід готового продукту становить 19,5-20,5% від повітряно-сухої сировини.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1

1,1кг подрібненого повітряно-сухого листя гледичії завантажували у реактор з мішалкою і паровою сорочкою, заливали 11л гарячої води 90°C і перемішували протягом 1,5 годин при постійно витриманій температурі 90°C. Екстракцію повторювали двічі, додаючи по 9,9л води. Одержані

екстракти 9,8л, 9,2л і 9,3л відповідно, об'єднували і упарювали на вакуумно-випарювальному апараті до повного висушування. Сухий екстракт подрібнювали. Вихід цільового продукту склав 220,0г, тобто 20%.

Приклад 2

Протизапальну активність комплексу БАР листя гледичії, одержаного за заявленим способом, вивчали на моделі карагенінового і формалінового

набряків на білих щурах, які були розподілені на 5 груп: дослідні, ті, яких лікували одержаним препаратом листя гледичії у дозах 25, 50, 100мг/кг, ті, яких лікували препаратом порівняння і контрольні. В якості препарату порівняння використовували диклофенак натрію в оптимальній для нього дозі 10мг/кг. За критерій протизапальної активності було обрано відсоток пригнічення набряку. Результати представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

Порівняльна оцінка протизапальної активності одержаного препарату листя гледичії на моделях карагенінового та формалінового набряків лапок щурів ($M \pm m$, $n=7-10$)

Варіанти дослідів	Доза мг/кг	Вихідна товщина лапки щура (мм)	Товщина лапки через 3 години (мм)	% набряку(у порівнянні з вихідним)	Протизапальна активність, %
Карагеніновий набряк (1% р-н карагеніну) 0,1мл субплантарно					
Інтактна група		4,46 \pm 0,10	7,15 \pm 0,19	60,30%	0
Диклофенак натрію	10	4,52 \pm 0,09	5,66 \pm 0,14	25,80%	57,2%
Препарат гледичії	25	3,89 \pm 0,12	5,16 \pm 0,18	32,92%	45,4%
Препарат гледичії	50	4,32 \pm 0,10	5,19 \pm 0,16	20,57%	65,9%
Препарат гледичії	100	4,06 \pm 0,08	4,73 \pm 0,09	16,42%	72,8%
Формаліновий набряк (2% р-н формаліну) 0,1мл субплантарно					
Інтактна група		4,11 \pm 0,13	8,46 \pm 0,19	107,2%	0
Диклофенак натрію	10	4,42 \pm 0,13	7,57 \pm 0,25	73,1%	31,8%
Препарат гледичії	50	4,42 \pm 0,17	7,64 \pm 0,24	76,4%	28,7%

Аналіз даних таблиці 2 свідчить, що на моделях карагенінового набряку препарат листя гледичії у дозах 50 і 100мг/кг виявляє виражений протизапальний ефект і перевищує препарат порівняння - диклофенак натрію на 15,2% і 27,3% відповідно. На моделі формалінового набряку препарат гледичії дещо поступився дії референс-препарату.

Приклад 3

Знеболюючу активність препарату гледичії, одержаного за заявленим способом, вивчали на 76 білих нелінійних щурах-самцях у порівнянні з референс-препаратом - диклофенаком натрію, визначали на моделі електричного подразнення

слизової оболонки прямої кишки. За поріг больової чутливості (ПБЧ) приймали найменшу силу електричного струму, яка викликала больове відчуття у тварини, що проявлялось у локалізації болі і/або відсмикування лапок від підлоги. Досліджуваний препарат вводили внутрішньошлунково у дозах 25, 50 і 100мг/кг після попереднього розчинення у дистильованій воді. Диклофенак натрію (10мг/кг) вводили внутрішньошлунково одноразово. Порівнювали вихідні показники ПБЧ та зміни його через 2 години після введення досліджуваних препаратів. Результати досліджень наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Вплив препарату гледичії на поріг больової чутливості на моделі електричного подразнення слизової оболонки прямої кишки щурів у порівнянні з диклофенаком натрію ($M \pm m$, $n=7-17$)

Варіант дослідів	Доза, мг/кг	Вихідний ПБЧ (mA)	ПБЧ через 2год. після внутрішньошлункового введення сполук	% підвищення ПБЧ порівняно з вихідним
Дистильована вода		4,0 \pm 0,19	4,14 \pm 0,21	3,6%
Диклофенак натрію	10	4,71 \pm 0,13	6,26 \pm 0,17	33,8%
Препарат гледичії	25	4,50 \pm 0,19	5,36 \pm 0,24	19,4%
Препарат гледичії	50	4,29 \pm 0,21	5,50 \pm 0,24	28,9%
Препарат гледичії	100	4,43 \pm 0,23	5,29 \pm 0,26	20,2%

Аналіз даних таблиці 3 свідчить, що препарат гледичії проявляє більш виражений знеболюючий ефект, проте за силою дії він поступається референс-препарату - диклофенаку натрію.

Приклад 4

Дослідження гіпотензивної дії препарату гледичії звичайної, одержаного за заявленим спосо-

бом, проводили на самцях білих нелінійних щурів масою 430-500г під кетаміновим наркозом (100мг/кг) за допомогою флуометру "Transonic Animal Research Flowmeters T106 Series" (USA). Артеріальний тиск вимірювали за допомогою датчика "Transonic Pressure Transducer", який приєднували до внутрішньовенного катетера і вводили у

загальну сонну артерію [5]. Для попередження зсідання крові у датчик і катетер вводили гепарин (із розрахунку 0,1мл гепарину + 0,9мл ізотонічного розчину натрію хлориду). Величина артеріального тиску (АТ) вимірювалась у мм.рт.ст. Реєструвались вихідні значення АТ, а також зміни його спочатку через 5 хвилин, а потім кожні 10 хвилин протягом 1 години після одноразового внутрішньовенного (у стегнову вену) введення досліджуваного препарату у дозі 50мг/кг.

Контрольною групою слугували тварини, яким замість досліджуваних препаратів внутрішньовен-

но вводили еквівалентну кількість ізотонічного розчину натрію хлориду.

В якості референс-препарату було обрано 2% розчин папаверину гідрохлориду у дозі 10мг/кг.

Крім дослідів на інтактних тваринах, гіпотензивна дія сумарного препарату гледичії звичайної досліджувалась на моделі гіпертензії, яку відтворювали внутрішньовенним введенням α -адреноміметика мезатона (10мг/кг), який вводили внутрішньовенно за 10 хвилин до досліджуваного препарату. Результати досліджень наведені у таблиці 4.

Таблиця 4

Зміни артеріального тиску під впливом сумарного препарату гледичії у порівнянні з папаверину гідрохлоридом у щурів ($M \pm m$, $n=5$)

Вихідний АТ, мм.рт.ст.	Через 10хв. після мезато- ну	Час після введення препаратів						
		5хв.	10хв.	20хв.	30хв.	40хв.	50хв.	60хв.
Контроль (ізотонічний розчин натрію хлориду)								
57,8±2,78	-	58,0 ±2,81	56,6 ±2,44	55,0 ±2,88	55,8 ±2,92 -3,5%	54,0 ±2,59	53,8 ±2,82	54,4 ±2,99 -5,9%
Препарат гледичії (50мг/кг внутрішньовенно)								
56,2±2,33	-	59,4 ±2,48	58,0 ±2,97	55,0 ±2,74	51,2 ±1,85 -8,8%	51,0 ±1,34	50,6 ±1,33	50,0 ±1,3 -10,8%
59,6±1,72	111,6 ±2,25 +87,8%	110,2 ±2,15	101,2 ±1,36	97,6 ±2,5	90,4 ±1,47 -18,9%	86,4 ±0,68	84,6 ±0,81	82,6 ±1,17 -25,9%
Папаверину гідрохлорид (10мг/кг внутрішньовенно)								
59,0±2,21	-	55,2 ±1,88	50,8 ±1,53	49,8 ±1,11	46,8 ±1,32 -20,5%	46,2 ±1,07	45,8 ±1,16	45,6 ±1,75 -22,7%

За даними табл.4 препарат гледичії проявляє гіпотензивну дію, і дещо перевищує референс-препарат, що підтверджується його здатністю знижувати артеріальний тиск у сонній артерії щурів на 10,8% у порівнянні з вихідним рівнем. Попереднє введення α -адреноміметика мезатону підвищує гіпотензивний ефект препарату; зменшення артеріального тиску складає 25,9%, що дещо перевершує дію референс-препарату папаверину гідрохлориду.

Приклад 5

Дослідження гострої токсичності препарату гледичії, одержаного за заявленим способом, проводили у діапазоні доз від 100мг/кг до 1000мг/кг. Препарат вводили дослідним тваринам внутрішньоочеревинно у відповідних дозах, розчиняючи його у необхідній кількості фізіологічного розчину. Якщо обсяг препарату перевищував 5мл, введення проводили дрібно протягом доби. Для розрахунку середньої летальної дози (LD_{50}) через 14 днів визначали відсоток летальності у кожній групі тварин і за допомогою таблиць, а також розрахунків відповідно до методу пробіт-аналізу кривих летальностей за В.Б. Прозоровським визначали значення LD_{50} [6].

При дослідженні низьких та середніх доз препарату видимих ознак впливу на зовнішній вигляд, апетит чи поведінку щурів зареєстровано не було.

Відсутність летальності у щурів дозволяє вважати, що значення LD_{50} для препарату гледичії перевищує максимальну дозу, яку використовували в експерименті, тобто у щурів при внутрішньочеревинному введенні $LD_{50} > 1000$ мг/кг. Дане значення LD_{50} дозволяє віднести препарат гледичії за класифікацією К.К. Сидорова до VI класу токсичності - відносно нешкідливі речовини [6].

В результаті здійснення заявленого способу одержують комплекс біологічно активних речовин з вираженими фармакологічними активностями: протизапальною, знеболюючою та гіпотензивною, який є перспективним для використання в якості лікарської субстанції при створенні лікарських препаратів з широким спектром фармакологічної активності.

Заявлений спосіб дає змогу раціонального використання вітчизняних сировинних ресурсів, є економічним, безпечним і легко відтворюваним на підприємствах фармацевтичної галузі України.

Джерела інформації:

1. Патент на винахід 77795, Україна, МПК(2006) А61К36/185, А61Р1/04 (2006.01), А61Р29/00, А61Р39/00, заявл. 22.11.2004, опубл. 15.01.2007, Бюл. №1.

2. Патент на винахід 79383, Україна, МПК(2006) А61К36/61 (2007.01), А61Р29/00, заявл. 28.11.2005, опубл. 11.06.2007, Бюл. №8.

3. Патент на корисну модель 23647, Україна, МПК(2006) А61К36/00, заявл. 19.10.2006, опубл. 11.06.2007, Бюл. №8.

4. Современная фитотерапия / Под ред. В. Петкова, София, «Медицина и физкультура», 1988, С.148-149.

5. Доклінічні дослідження лікарських засобів (Методичні рекомендації) / За ред. Стефанова О.В. - К.: Авіценна, 2001. - 527с.

6. Прохоровський В.Б. Практическое пособие по ускоренному определению средних эффективных доз и концентрации биологически активных веществ. - СПб, 1992 - 42с.