



УКРАЇНА

(19) UA (11) 96689 (13) C2

(51) МПК (2011.01)  
A61K 36/48 (2006.01)  
A61P 1/00  
A61P 7/00  
A61K 31/00ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЮ, РЕГЕНЕРУЮЧОЮ ТА ГЕМОСТАТИЧНОЮ ДІЄЮ

1

2

(21) а201009806

(22) 06.08.2010

(24) 25.11.2011

(46) 25.11.2011, Бюл.№ 22, 2011 р.

(72) ЧЕРКАШИНА АЛІНА ВІКТОРІВНА, КОВАЛЬОВ ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ, КОВАЛЬОВ СЕРГІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ, ГРИЦИК АНДРІЙ РОМАНОВИЧ, КОНОНЕНКО НАДІЯ МИКОЛАЇВНА, ТЮПКА ТЕТЯНА ІВАНІВНА, ШЕВЦОВ ІГОР ІВАНОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(56) UA 30879 A, 15.02.2003.

UA 23647 U, 11.06.2007.

UA 38150 U, 25.12.2008.

UA 40243 A, 16.07.2001.

UA 29304 U, 10.01.2008.

RU 2158600 C1, 10.11.2000.

RU 2238755 C1, 27.10.2004.

RU 2213570 C2, 10.10.2003.

RU 2352347 C1, 20.04.2009.

(57) Спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з гепатопротекторною, регенеруючою та гемостатичною дією шляхом трикратної екстракції подрібненої рослинної сировини водою при загальному співвідношенні сировини до екстрагенту 1:23 при постійно підтримуваній температурі 80 °С з подальшим об'єднанням відфільтрованих екстрактів, їх упарюванням, очищенням спиртом етиловим 96 % та сушінням, який **відрізняється** тим, що як рослинну сировину використовують траву нуту звичайного (*Cicer arietinum* L.), першу екстракцію проводять при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 протягом 2,0 годин, другу та третю - при співвідношенні 1:8 та 1:5 відповідно по 0,5 години кожна.

Винахід належить до хіміко-фармацевтичної промисловості, зокрема до способів одержання засобів рослинного походження з гепатопротекторною, регенеруючою та гемостатичною дією, які можуть бути використані як активна субстанція при створенні відповідних лікарських препаратів у різних лікарських формах, придатних для лікування і профілактики захворювань печінки та підшлункової залози.

Хвороби печінки та підшлункової залози належать до серйозних життєво небезпечних хвороб сучасності. Постійне збільшення кількості хворих пов'язано у першу чергу з загостренням екологічного стану, ураженнями печінки при гострих отруєннях (у тому числі зловживання алкоголем, харчові отруєння), медикаментозному впливі. А отже, існує значна потреба у лікарських препаратах з гепатопротекторною, регенеруючою та гемостатичною дією.

У народній медицині рослинні екстракти здавна використовували для лікування захворювань гепатобіліарної системи, серед яких особливе місце займають хвороби печінки та підшлункової залози. Сучасна медична практика широко використовує лікарські засоби рослинного походження. Адже, на відміну від синтетичних такі засоби споріднені до організму людини за біологічною природою, вони практично позбавлені негативної побічної дії, відзначаються низькою токсичністю та придатністю до тривалого застосування без формування залежності тощо.

Існують різні способи одержання з рослинної сировини засобів, які мають гепатопротекторну дію у комплексі з іншими видами фармакологічної активності.

Відомий спосіб одержання засобу з гепатопротекторною дією з сухої трави гороху посівного [1] шляхом екстрагування подрібненої сировини 10-кратною кількістю 49-51% етилового спирту протя-

(13) C2

(11) 96689

(19) UA

гом 11-12 годин з подальшим упарюванням екстракту до водного залишку з наступним очищенням від речовин ліпофільної природи хлористим метиленом при співвідношенні водного залишку до хлористого метилена 3:4 з подальшим сушінням до сухого залишку.

Недоліком способу є одержання засобу з вузькоспрямованою фармакологічною дією та надмірні витрати хлористого метилена [1].

Найближчим до заявленого способу за сукупністю ознак є спосіб одержання комплексу полісахаридів гемостатичної та протизапальної дії [2], який передбачає принаймні двократну екстракцію листя акації білої водою при температурі 90°C при співвідношенні сировина:екстрагент 1:14-1:15 протягом 2-3 годин з подальшим об'єднанням одержаних зливів і упарюванням до 1/15 попереднього об'єму, осадженням трикратною кількістю спирту етилового та промиванням осаду спиртом етиловим, сушінням, подрібненням. Вихід комплексу полісахаридів становить 5,5-7,0 %.

До недоліків відомого способу [2] можна віднести невеликий вихід готового продукту. Крім того, спосіб не дозволяє одержати засіб з комплексною гепатопротекторною, регенеруючою та гемостатичною дією.

Задача винаходу є створення нового способу одержання комплексу біологічно активних речовин (БАР) з гепатопротекторною, регенеруючою та гемостатичною дією, який завдяки використанню як сировини трави нуту звичайного і проведення процесу при заданих параметрах забезпечує одержання ефективного засобу у формі рослинного екстракту з вираженою фармакологічною активністю, обумовленою комплексом біологічно активних речовин, вилучених саме таким способом, а заявлений спосіб є простим і економічно доцільним при промисловому здійсненні.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з гепатопротекторною, регенеруючою та гемостатичною дією шляхом трикратної екстракції подрібненої рослинної сировини водою при температурі 80°C з подальшим об'єднанням відфільтрованих екстрактів, упарюванням, осадженням спиртом етиловим, відокремленням осаду та сушінням, згідно з винаходом, як рослинну сировину використовують траву нуту звичайного (*Cicer arietinum* L.), першу екстракцію здійснюють при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 протягом 2,0 годин, другу та третю - 1:8 та 1:5 відповідно протягом 0,5 години кожна, екстракт упарюють до водного залишку, який очищують від полісахаридів спиртом етиловим 96 % при співвідношенні водний залишок: спирт етиловий 1:3 з подальшим сушінням до сухого залишку.

Пошук нових видів рослин з заданою біологічною активністю дозволяє одержувати з них засоби, які розширюють арсенал існуючих лікарських препаратів і сприяють здійсненню індивідуального підходу до лікування хворих. Як рослинна сировина для заявленого способу авторами було обрано траву нуту звичайного (*Cicer arietinum* L.). В народній медицині нут використовують як протидіабетичний та в'язучий засіб. Відваром з нуту поз-

бавляються від каменів у нирках та сечовому міхурі, компреси з молодих рослин виликовують запалення, покращують колір шкіри, попереджують шкіряні захворювання і знищують бородавки [3]. Авторами вперше було виявлено гепатопротекторну, регенеруючу та гемостатичну дію трави нуту звичайного, не відому з джерел інформації.

Всі параметри заявленого способу визначено експериментальним шляхом з урахуванням біологічної активності одержаних комплексів, ефективності, доступності та нешкідливості реактивів, практичного відтворення способу у промислових умовах.

Дослідним шляхом було визначено, що оптимальним екстрагентом для трави нуту звичайного є вода. Саме такий екстрагент у сукупності з рештою параметрів заявленого способу, а саме трикратною екстракцією сировини при загальному співвідношенні сировини до екстрагента 1:23 і тривалості першої екстракції - 2 години, кожної наступної - по 0,5 години при постійно підтримуваній температурі 80°C забезпечує інтенсифікування процесу екстрагування, що дозволяє максимально вилучати з сировини БАР, який має гепатопротекторну, регенеруючу та гемостатичну дію. Крім того, такий екстрагент вигідний з боку технологічних вимог до здійснення способу, бо є доступним, дешевим та екологічно безпечним.

Сумарне співвідношення сировини до екстрагента 1:23 визначено експериментально та є оптимальним для вибраної сировини. Перший етап екстракції здійснюють при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 (з урахування коефіцієнту водопоглинання сировини,  $K=0,19$ ), другий та третій - при співвідношенні 1:8 та 1:5 відповідно. Менша кількість екстрагента на кожному етапі не дозволяє ефективно провести екстракцію, а більша кількість є нераціональною, тому що повна екстракція досягається заявленою кількістю екстрагента.

Загальна тривалість усіх етапів екстракції складає 3 години і є достатньою для вичерпного вилучення з сировини комплексу біологічно активних сполук з гепатопротекторною, регенеруючою та гемостатичною дією.

В результаті здійснення заявленого способу одержують комплекс БАР - порошок світло-коричневого кольору зі специфічним запахом, гіркуватий на смак, добре розчинний у воді, спиртоводних розчинах, практично не розчинний в ефірі та хлороформі.

Заявлений спосіб здійснюється наступним чином. Подрібнену повітряно-суху траву нуту звичайного піддають трикратній екстракції гарячою водою при загальному співвідношенні сировина:екстрагент 1:23 та загальній тривалості екстракції - 3 години при температурі 80°C. Першу екстракцію здійснюють при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 протягом 2,0 годин, другу та третю - 1:8 та 1:5 відповідно протягом 0,5 години кожна. Одержані водні екстракти об'єднують, відфільтровують та упарюють до водного залишку, який очищують спиртом етиловим 96 % при співвідношенні водний залишок: спирт етиловий 1:3 з подальшим сушінням до сухого залишку. Сухий екстракт подрібнюють. Вихід готового про-

дукту становить 20,0-21,0 % від повітряно-сухої сировини.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1.

1,0 кг подрібненої повітряно-сухої трави нуту звичайного залили 11,9 л гарячої води і екстрагували при перемішуванні та постійно підтримуваній температурі 80°C протягом 2,0 годин. Екстракт злили у приймальник. Процес повторили ще двічі порціями 8,0 л та 5,0 л екстрагенту по 0,5 години після кожного додавання екстрагенту. Одержані екстракти 9,9 л, 7,8 л, 4,9 л відповідно, об'єднали, упарили до 0,8 л. Водний залишок осаджували 2,4 л спиртом етиловим 96 %, осад відфільтровували та упарювали до повного висушування. Сухий екстракт подрібнювали. Вихід сухого екстракту склав 206,0 г, тобто 20,6 %.

Приклад 2.

Вивчення гепатопротекторної дії комплексу БАР трави нуту звичайного, одержаного за заявленим способом, проводили на білих щурах масою 0,21-0,24 кг, на моделі гострого токсичного ураження печінки тетрахлорметаном за методикою В.С. Позднякова, Н.Г. Іванова [4]. Гостре токсичне ураження печінки відтворювали шляхом дворазового підшкірного введення 50 % олійного розчину

тетрахлорметану у дозі 0,8 мл на 0,1 кг маси тіла через кожні 24 години (протягом 2-х діб з проміжком у 24 год.) [5]. Досліджуваний екстракт та препарат порівняння силібор вводили тваринам за 1 годину до і через 2 години після введення тетрахлорметану. Тварини були розділені на 4 дослідних груп по 6 тварин в кожній: перша група - контрольна патологія; тваринам другої групи на тлі тетрахлорметанового ураження печінки вводили комплекс БАР трави нуту в дозі 25 мг/кг маси тіла тварини; тварини третьої групи поряд з тетрахлорметаном отримували в якості референс-препарату силібор у терапевтичній дозі 25мг/кг; четверта група - група інтактного контролю. Щурів декапітували на 3 добу з моменту першого введення тетрахлорметану.

Вивчення біохімічних та функціональних показників стану печінки проводили через 24 год. після останнього введення тетрахлорметану. Активність аспартатамінотрансферази (АсАТ) і аланінамінотрансферази (АлАТ) визначали уніфікованим динітрофенілгідразиновим методом за допомогою стандартного набору реактивів. Рівень гемоглобіну, число еритроцитів і лейкоцитів визначали за загальноприйнятими методиками [6]. Результати біохімічних показників крові наведені у табл. 1.

Таблиця 1

Вивчення гепатопротекторної дії одержаного за заявленим способом комплексу біологічно активних речовин трави нуту звичайного (n=6)

Об'єкт дослідження	Еритроцити, $\times 10^{12}/\text{л}$	Лейкоцити, $\times 10^9/\text{л}$	Гемоглобін, г/л	АсАТ, мкмоль/год.-мл	АлАТ, мкмоль/год.-мл
Контрольна патологія	6,04±0,3	17,97±0,10	111±4,5	0,96±0,03	1,14±0,02
Комплекс БАР трави нуту звичайного	6,70±0,3	13,4±0,10	129±3,0	0,48±0,02	0,60±0,03
Силібор	7,24±0,21	12,21±0,10	130±3,0	0,48±0,03	0,59±0,02
Інтактні тварини	7,44±0,25	12,98±0,06	135±4,0	0,40±0,02	0,56±0,03

Аналіз даних табл. 1 свідчить, що комплекс БАР трави нуту звичайного, одержаний за заявленим способом, проявляє виражену гепатопротекторну дію, дещо поступаючись препарату порівняння силібор. У тварин другої групи спостерігається чітко виражена спрямованість до нормалізації активності вивчених ферментів (активність АлАТ в сироватці крові знизилась в 1,9 разу; АсАТ - в 2,0 рази), зростання числа еритроцитів і рівня гемоглобіну у порівнянні до тварин контрольної групи.

Приклад 3.

Вивчення регенеруючої дії комплексу БАР трави нуту звичайного, одержаного за заявленим способом, проводили на білих щурах масою 0,18-0,22 кг, поділених на три групи на моделі гострого панкреатиту за методикою Герелюка І.П. та співавторів [7]. Гострий панкреатит відтворювали шляхом перорального введення тваринного жиру

у дозі 10,0 г/кг та алкоголю у дозі 1,6 г/кг після 12-годинного голодування з наступним піддаванням тварин імобілізаційно-холодовому стресу протягом 3 годин [7]. Тваринам першої групи, протягом 14 діб після відтворення гострого панкреатиту, вводили внутрішньочеревно розчин екстракту з трави нуту, одержаного за заявленим способом, у дозі 50 мг/кг маси тварини. Тварин другої групи після відтворення гострого панкреатиту не лікували. Третя група - інтактні тварини.

Тварин декапітували через 14 діб з моменту першого введення тваринного жиру та алкоголю. Вивчення біохімічних показників крові визначали за допомогою аналізатора глюкози АГКМ-01, активність  $\alpha$ -амілази - автоматичного аналізатора ACCENT-200 з використанням реактивів фірми PZ CORMAY S.A. (Польща).

Результати біохімічних показників крові дослідних тварин наведені у табл. 2.

Таблиця 2

Вивчення регенеруючої дії одержаного за заявленим способом комплексу біологічно активних речовин трави нуту звичайного (n=6)

Група тварин	Об'єкт дослідження	Глюкоза, ммоль/л	Амілаза, од/л
1	Комплекс БАР трави нуту	8,18±0,09	215,25±11,11
2	Контроль	10,28±0,18	328,70±10,12
3	Інтактні тварини	5,08±0,09	78,01±3,10

Аналіз даних табл. 2 свідчить, що комплекс БАР трави нуту звичайного, одержаний за заявленим способом, у 1,26 разу знижує вміст глюкози в крові і у 1,53 разу знижує активність амілази, а отже проявляє виражену регенеруючу дію на підшлункову залозу.

Фармакологічну активність дії комплексу БАР трави нуту звичайного, одержаного за заявленим способом, підтверджували шляхом проведення морфолого-анатомічного дослідження внутрішніх органів щурів. Мікроскопічне дослідження проводили на шматочках підшлункової залози, яку фіксували в формаліні з наступним виготовленням парафінових зрізів. Гістологічні препарати фарбували гематоксиліном-еозином. Наявність або відсутність патологічних змін в органах досліджуваних тварин визначали за допомогою мікроскопа МБР-1 при 200-, 400-, 800-разовому збільшенні [5, 6, 8].

У інтактних тварин (третья група) гістологічна будова підшлункової залози відповідає нормі: тканина підшлункової залози часточкової будови, ацинарна та острівкова, частини диференціюються чітко, помірно повнокров'я. У тварин другої групи морфологічно підтверджено гострий геморагічно-гнійний панкреатит з явищами панкреонекрозу: некроз паренхіми, декомплексация ацинарної частини, порушення часточкової будови, виражений набряк, інфільтрація тканини поліморфноядерними запальними клітинами.

При вивченні гістологічних препаратів тварин першої групи спостерігався набряк стоми, з частковим здавленням панкреатичних острівців Лангерганса та розширенням міжчасточкових вивідних протоків, що свідчить про наявність запального процесу у тканинах підшлункової залози. На відміну від тварин другої групи, у тварин першої групи не спостерігалися масивні просякання еритроцитами, виражені некрози паренхіми та жирові некрози з формуванням абсцедуючих порожнин та секвестрів.

Слід відмітити, що кровоносні судини повнокровні, при цьому збережена часточкова будова

ацинарної частини та острівкового апарату залози (як і у інтактних тварин), що свідчить про регенеруючу дію комплексу БАР трави нуту звичайного, одержаного за заявленим способом.

Приклад 4.

Гемостатичну дію комплексу БАР трави нуту звичайного, одержаного за заявленим способом, вивчали на білих нелінійних щурах-самцях масою 190-200 г на моделі кровотеч із кінчика хвоста щура [5]. Водний розчин екстракту комплексу БАР трави нуту вводили внутрішньочеревно через зонд у дозах 80 мг/кг, 150 мг/кг, 200 мг/кг, 250 мг/кг та 300 мг/кг. Препарат порівняння, рідкий екстракт деревію вводили внутрішньочеревно через зонд у кількості 300 мг/кг маси щура, що відповідає кількості сухої речовини 150 мг/кг. Інтактним тваринам вводили дистильовану воду у кількості 1,5 мл на одного щура.

Через 1 годину після введення комплексу БАР трави нуту звичайного тварин поміщали у прилад для фіксації дрібних лабораторних тварин і зрізали кінчик хвоста. Отриману краплю крові наносили на попередньо знежирене 96 % спиртом етиловим предметне скло. При яасному освітленні через краплю з інтервалом 2 секунди проводили вістрям голки до появи першої нитки фібрину. Час від появи краплі крові до появи першої нитки фібрину фіксували у секундах за допомогою секундоміру.

Дію досліджуваного комплексу БАР на згортання крові оцінювали у порівнянні з даними інтактних тварин. Гемостатичну активність розраховували за формулою:

$$A = \frac{t_{\text{інт}} - t_{\text{експ}}}{t_{\text{інт}}} \times 100 + 100\%,$$

де:

$t_{\text{інт}}$  - середній час до появи нитки фібрину в інтактній групі;

$t_{\text{експ}}$  - середній час до появи нитки фібрину в групах, що отримували досліджувану субстанцію;

A - гемостатична активність, у %.

Результати дослідження наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Вивчення гемостатичної дії одержаного за заявленим способом комплексу біологічно активних речовин трави нуту звичайного (n=6)

Об'єкт дослідження	Доза, мг/кг	Гемостатична активність, %
Комплекс БАР трави нуту	80	163,1
Комплекс БАР трави нуту	150	138,3
Комплекс БАР трави нуту	200	149,2
Комплекс БАР трави нуту	300	150,8
Рідкий екстракт деревію	300	140,1
Інтактні тварини	-	100,0

Аналіз даних табл. 3 свідчить, що комплекс БАР трави нуту звичайного, одержаний за заявленим способом, проявляє виражену гемостатичну активність і перевищує дію референс-препарату на 23 % у найбільш терапевтично ефективній дозі - 80 мг/кг.

Таким чином, заявлено новий спосіб одержання комплексу БАР трави нуту звичайного з гепатопротекторною, регенеруючою та гемостатичною дією. Засіб, одержаний за заявленим способом, є нетоксичним, без побічних дій, придатним до тривалого застосування, а отже є перспективним для використання в якості лікарської субстанції при створенні лікарських препаратів з вищезазначеним спектром фармакологічної активності.

Заявлений спосіб може бути здійснений в умовах стандартного фармацевтичного підприємства, з використанням стандартного обладнання та екологічно безпечних реактивів. Спосіб передбачає використання доступної вітчизняної рослинної сировини.

Заявлений спосіб дає змогу раціонально використовувати вітчизняні сировинні ресурси, є економічним, безпечним та легко відтворюваним на фармацевтичних підприємствах України.

#### Джерела інформації:

1. Патент на винахід № 30879, Україна, МПК 7 А61К 9/20, А61Р 1/16, з. № 98063104, заявл. 16.06.1998, опубл. 16.06.2003, Бюл. № 6.
2. Патент на корисну модель № 23647, Україна, МПК (2006) А61К 36/00, заявл. 19.10.2006, опубл. 11.06.2007, Бюл. № 8.
3. Кьосев П.А. Полный справочник лекарственных растений. - М.: ЭКСМО-Пресс, 2001. - С. 236-237.
4. Поздняков В.С., Иванов Н.Г. Изменение функционального состояния у крыс при воздействии четыреххлористого углерода //Токсикология новых промышленных хим. веществ. - М.: Медицина, 1979. - Вып. 15. - С. 87-90.
5. Доклінічні дослідження лікарських засобів /За ред. член. - кор. АМН України О.В. Стефанова. - К., 2001.-528 с.
6. Лабораторные методы исследования в клинике /Под ред. В.В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - С. 189-190.
7. Патент на изобретение № 01497634, RU. Способ моделирования острого панкреатита / Герелюк И.П., Збирак Н.П., Горбачевский Б.П., Збирак И.Н. Опубл. 30.07.1989.
8. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. - М., 1982. - 304 с.