



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76694** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61K 36/00
A61K 9/08 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 08293	(72) Винахідник(и): Марчишин Світлана Михайлівна (UA), Амброзюк Ольга Богданівна (UA), Яковлева Лариса Василівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 06.07.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.01.2013	(73) Власник(и): ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО, Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.01.2013, Бюл.№ 1	

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ РОСЛИННОЇ СУБСТАНЦІЇ З ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ТА
ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЮ АКТИВНІСТЮ**

(57) Реферат:

Спосіб одержання рослинної субстанції з протизапальною і гепатопротекторною активністю включає проведення екстракції біологічно активних речовин 70 % етиловим спиртом. Спиртовий екстракт відфільтровують крізь паперовий фільтр під вакуумом і згущують до водного залишку в ротаційно-вакуумному випарнику, проводять екстрагування киплячою водою, водну витяжку згущують у роторно-вакуумному випарнику до 1/5 об'єму. Отримані спиртову і водну витяжки об'єднують і висушують у роторно-вакуумному випарнику до сухого порошку.

UA 76694 U

Корисна модель належить до фармації, зокрема до способів одержання фармакологічно активної субстанції з лікарської сировини, а саме з трави перстачу гусячого (*Potentilla anserina* L.), комплексу фенольних сполук (дубильних речовини, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот) із вираженою протизапальною і гепатопротекторною активністю для використання їх як діючих речовин лікарських засобів протизапальної і гепатопротекторної дії.

Відомий спосіб одержання рослинної субстанції з протизапальною та гепатопротекторною активністю, зокрема пирію повзучого, що включає технологічний етап екстрагування [1].

Недоліком відомого способу є недостатній рівень технологічності, що впливає із обмеження його лише станом водного екстрагування. В силу цього розчинні в спирті компоненти не потрапляють в екстракт. Наведене обумовлює недостатній спектр фармакологічної активності.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки способу одержання рослинної субстанції з протизапальною та гепатопротекторною активністю шляхом спиртоводного екстрагування з рослинної сировини трави перстачу гусячого біологічно активних речовин, які мають протизапальну і гепатопротекторну дію.

При вирішенні технічної задачі були взяті до уваги результати попередніх досліджень, які показали, що трава перстачу гусячого містить біологічно активні речовини: флавоноїди, дубильні речовини, гідроксикоричні кислоти, органічні кислоти, які характеризуються протизапальними та гепатопротекторними властивостями, а отриманий сухий екстракт трави перстачу гусячого (ЕПГ) у вигляді сухої субстанції є перспективним для використання як протизапального і гепатопротекторного засобу [3, 4].

Виходячи з наведеного, одержання фармакологічно активної субстанції з трави перстачу гусячого (*Potentilla anserina* L.) проводять екстракцією біологічно активних речовин 70 % етиловим спиртом, спиртовий екстракт відфільтровують крізь паперовий фільтр під вакуумом і згущують до водного залишку в ротаційно-вакуумному випарнику, проводять екстрагування киплячою водою, водну витяжку згущують у роторно-вакуумному випарнику до 1/5 об'єму, згущені спиртову і водну витяжки об'єднують і висушують у роторно-вакуумному випарнику до сухого порошку.

Спосіб здійснюють наступним чином. Сировину (траву перстачу гусячого), подрібнену до розміру частинок, які проходять крізь сито з діаметром отвору № 2800, заливають 70 % спиртом етиловим до дзеркала, з урахуванням коефіцієнта водопоглинання сировини, і екстрагують протягом 15-20 год. при кімнатній температурі. Спиртову витяжку зливають, залишки екстракту видаляють з сировини фільтрацією під вакуумом. Одержаний спиртовий екстракт відфільтровують крізь паперовий фільтр під вакуумом і згущують до водного залишку в ротаційно-вакуумному випарнику. Сировину заливають киплячою водою до дзеркала і екстрагують протягом 2 годин на водяній бані. Водний екстракт зливають, фільтрують. Екстракцію повторюють ще двічі по 1 годині. Водну витяжку згущують в роторно-вакуумному випарнику до 1/5 об'єму. Згущені спиртову і водну витяжки об'єднують і висушують до одержання сухого порошку у роторно-вакуумному випарнику.

Приклад 1

100 г трави перстачу гусячого, подрібненої до розміру частинок, які проходять крізь сито з діаметром отвору № 2800, заливали 70 % спиртом етиловим до дзеркала і екстрагували протягом 15-20 год. при кімнатній температурі. Спиртовий екстракт відфільтровували крізь паперовий фільтр під вакуумом і згущували до водного залишку в ротаційно-вакуумному випарнику. Сировину заливали киплячою водою до дзеркала і екстрагували протягом 2 годин на водяній бані. Водний екстракт зливали і фільтрували. Екстракцію повторювали ще двічі по 1 годині. Водну витяжку згущували в роторно-вакуумному випарнику до 1/5 об'єму. Згущені спиртову і водну витяжку об'єднували і висушували до одержання сухого порошку у роторно-вакуумному випарнику. Маса отриманого сухого екстракту становила 152, 92 г, вихід сухого порошку - 34,52 %.

Сухий екстракт - це однорідний порошок коричневого кольору, гігроскопічний, який розчиняється у воді, не розчиняється в органічних розчинниках, у спирті утворює осад, Отриманий сухий екстракт гіркий на смак, з приємним специфічним запахом.

Приклад 2

З метою визначення протизапальної активності сухого екстракту перстачу гусячого проведено експериментальні дослідження на білих безпородних щурах масою 160-180 г по 6 тварин у групі на моделі гострого карагенінового набряку лапи. набряк викликали субплантарним введенням у праву задню лапу 0,1 мл 1 % розчину карагеніну [2]. Водний розчин ЕПГ вводили внутрішньошлунково у профілактичному режимі протягом 5 діб у дозах 11, 25 та 50 мг/кг (доза вибрані довільно). Останнє введення ЕПГ здійснювали за 1 годину до ін'єкції флоготропного агента. Як препарат порівняння використовували диклофенак натрію, який

вводили однократно, внутрішньошлунково, у дозі 8 мг/кг за 1 годину до моделювання набряку. Тварини з групи контрольної патології отримували питну воду в еквівалентному об'ємі (1 мл/100 г маси). Величину набряку вимірювали за допомогою онкометра за А.С. Захаревським кожної години протягом 5 години. Антиексудативну активність препарату визначали за ступенем зменшення набряку у дослідних тварин у порівнянні з контрольними і виражали у відсотках за формулою.

$$A = \frac{\Delta V_k - \Delta V_d}{\Delta V_k} \times 100 \%,$$

де ΔV_k - середня різниця між об'ємами набряклої і вихідним значенням лапи в групі контрольної патології;

ΔV_d - середня різниця між об'ємами набряклої і вихідним значенням лапи в дослідних групах.

Результати дослідів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Протизапальна активність екстракту трави перстачу гусячого на моделі карагенінового набряку

Групи тварин	$\Delta_{\text{середнє}},$ Активність	1 год.	2 год.	3 год.	4 год.	5 год.
КП	$\Delta V, \bar{X} \pm S\bar{X}$	17,17±1,30	30,00±2,29	29,33±1,82	28,67±2,28	27,00±2,10
Диклофенак натрію, 8 мг/кг	$\Delta_{\text{середнє}}$	8,83±0,75*	10,17±0,40*	9,83±0,91*	9,17±1,25*	8,00±1,27*
	Активність, А (%)	49 %	67 %	66 %	68 %	70 %
ЕПГ, 11 мг/кг	$\Delta_{\text{середнє}}$	13,50±0,34**/**	18,50±1,12**/**	25,50±2,92**	26,17±2,74**	26,33±1,71**/**
	Активність А (%)	21 %	38 %	15 %	9 %	3 %
ЕПГ, 25 мг/кг	$\Delta_{\text{середнє}}$	13,33±0,80**/**	18,33±0,88**/**	19,33±0,67**/**	18,00±0,86**/**	16,17±1,01**/**
	Активність А (%)	22 %	39 %	34 %	37 %	40 %
ЕПГ, 50 мг/кг	$\Delta_{\text{середнє}}$	13,50±1,34**	20,83±1,30**/**	25,33±2,33**/**	28,33±2,63**/**	25,17±2,24**/**
	Активність А (%)	21 %	31 %	14 %	1 %	7 %

Примітки: 1. Метод Крускала-Уоліса та критерій Мана-Уїтні;

2. * - відхилення вірогідні щодо значень групи КП, при $p < 0,05$;

3. ** - відхилення вірогідні щодо значень групи, яка отримувала диклофенак натрію (ДН), при $p < 0,05$;

4. *** - відхилення вірогідні щодо значень групи ЕПГ у дозі 25 мг/кг, при $p < 0,05$;

5. n=6 – кількість тварин у групі.

Отримані дані (табл. 1) свідчать про те, що найвищу антиексудативну дію ЕПГ виявив у дозі 25 мг/кг. Ефект екстракту зберігався протягом усього терміну спостереження і дорівнював у середньому 41 %. Активність ЕПГ у дозах 11 та 50 мг/кг була дещо меншою і склала в середньому 17 та 15 % відповідно. Середнє значення антиексудативної активності препарату порівняння диклофенаку натрію за 5 годин дорівнювало 52 %. Можливим механізмом антиексудативної дії ЕПГ є здатність препарату стабілізувати клітинні мембрани за рахунок антиоксидантних властивостей та впливу фенолів на синтез лейкотрієнів, що забезпечує практично рівномірну антиексудативну дію засобу протягом всього періоду спостереження. Аналіз отриманих даних дозволяє зробити висновок про виразну активність ЕПГ у дозі 25 мг/кг.

Приклад 3

Вивчення гепатопротекторної активності ЕПГ проводили на моделі гострого токсичного гепатиту, викликаного тетрахлоретаном у порівнянні з капсулами силібору.

Досліди проведені на 45 білих нелінійних щурах самцях масою 200-250 г [4]. Тварини були розділені на 5 груп по 9 тварин у кожній: 1 група - інтактний контроль; 2 група - контрольна патологія, тварини, яким внутрішньошлунково вводили 50 % масляний розчин тетрахлорметану у дозі 0,7 мл/100 г маси; 3, 4 і 5 групи - тварини, які попередньо за 1 год. до введення CCl_4

отримували, відповідно, ЕПГ у дозах 11 мг/кг і 25 мг/кг або препарат порівняння силібор - у дозі 100 мг/кг.

- Досліджувані засоби тваринам вводили профілактично протягом 7 днів. Тварини контрольної патології отримували в еквівалентному об'ємі питну воду (1 мл/100 г маси).
 5 Гепатотоксин вводили щодня протягом 2 діб (8 та 9-ий день експерименту). На 10-у добу тварин наркотизували 1 % розчином барбіталу у дозі 0,8 мл/100 г маси тварини. Досліджували показники, що характеризують фізіологічний стан печінки: інтенсивність жовчовиділення та жовчоутворення [4], вміст у жовчі холестерину та жовчних кислот [5]. Потім тварин виводили з експерименту з дотриманням правил біоетики, збирали кров та вилучали печінку, яку зважували
 10 та вираховували її масовий коефіцієнт, за традиційними методами [4, 6].
 Результати дослідів наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Вплив сухого екстракту перстачу гусячого та силібору на показники зовнішньосекреторної функції печінки на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту у щурів.

Показник	Інтактний контроль	Контрольна патологія	ЕПГ, 11 мг/кг	ЕПГ, 25 мг/кг	Силібор, 100 мг/кг
Вживання тварин, %	100	78	100	100	100
МК печінки	2,75±0,10	4,26±0,23*	4,68±0,31*	4,37±0,16*	4,18±0,39*
Інтенсивність жовчовиділення, г/хв/100г	3,56±0,11	2,32±0,52	1,85±0,20т*(p=0,057)	3,08±0,43	2,76±0,70
холестерин, мг/100 г	36,28±1,23	26,55±2,49*	27,85±2,37*	30,14±3,84т* (p=0,056)	35,03±6,76
жовчні кислоти, мг/100 г	645,19±61,74	372,79±22,45*	547,93±170, 31	506,17±50,25** (p=0,032)	563,25±83,49 т** (p=0,071)
Холато-холестериновий коефіцієнт (ЖК/Х)	17,02±2,03	14,35±1,03	19,40±5,65	17,18±2,38	18,39±6,08

Примітки: Метод Крускала-Уоліса та критерій Мана-Уїтні;

1. *- відхилення вірогідні щодо значень групи інтактного контролю, при $p < 0,05$;
2. т* - відхилення прямує до вірогідних стосовно групи ІК, при $0,05 < p < 0,100$;
3. ** - відхилення вірогідні щодо значень групи КП, при $p < 0,05$;
4. т** - відхилення прямує до вірогідних стосовно групи КП, при $0,05 < p < 0,100$.

- Отримані дані свідчать, що найвиразнішу гепатопротекторну дію ЕПГ виявляє у дозі 25 мг/кг.
 15 Лікувально-профілактичне введення ЕПГ у цій дозі сприяло 100 % виживанню тварин, нормалізації функціонального стану печінки: відновлення жовчовидільної та жовчосекреторної функцій, збереженню білок- та ліпідосинтетичної функції. Крім того, засіб виявив помірні антиоксидантні властивості.

- Таким чином, запропонований спосіб забезпечує отримання біологічно активних речовин з
 20 трави перстачу гусячого у вигляді сухого екстракту із вираженою протизапальною і гепатопротекторною активністю і може бути використаний у промисловому виробництві лікарських препаратів на основі рослинної сировини, як засобу з протизапальною та гепатопротекторною дією.

Джерела інформації, які слід взяти до уваги:

- 25 1. Пат. 41203 У. Україна, (51) МПК (2009), А61К 36/00. Спосіб отримання фармакологічно активної субстанції із трави пирію повзучого / О.Б. Калущка, С.М. Марчишин. - № u200814366; заявл. 15.12.2008; опубл. 12.05.2009, Бюл. № 9, 2009 р.
2. Марчишин С.М. Дубильні речовини перстачу гусячого (*Potentilla anserine* L.) / С.М. Марчишин, О.Б. Амброзюк // Фармацевтичний журнал.-2011. - № 3. - С. 71-74.
- 30 3. Амброзюк О.Б. Біологічно активні речовини трави перстачу гусячого / Фармація України. Погляд у майбутнє. Матеріали VII Національного з'їзду фармацевтів України. - Харків, 2010. - С. 218.

4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. - К.: Авіцена, 2001.-528 С.

5. Определение содержания желчных кислот и холестерина в желчи / В.П. Мирошніченко, Л.Л. Громашевская, М.Г. Касаткина и др. // Лаб. дело.-1978. - № 3. - С. 149-153.

5 6. Методические рекомендации по экспериментальному изучению желчегонной, холеспазмолитической, холелитиазной и гепатопротекторной активности новых лекарственных средств (издание официальное) / С.М. Дроговоз, С.И. Сальникова, Н.П. Скакун и др. - Киев: ФКМЗ Украины, 1994.-46 С.

10

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання рослинної субстанції з протизапальною і гепатопротекторною активністю, що включає проведення екстракції біологічно активних речовин 70 % етиловим спиртом, який **відрізняється** тим, що спиртовий екстракт відфільтровують крізь паперовий фільтр під вакуумом і згущують до водного залишку в ротаційно-вакуумному випарнику, проводять екстрагування киплячою водою, водну витяжку згущують у роторно-вакуумному випарнику до 1/5 об'єму, отримані спиртову і водну витяжки об'єднують і висушують у роторно-вакуумному випарнику до сухого порошку.

15

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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