



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **100731** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
A61K 36/00
A61P 11/10 (2006.01)
A61P 29/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 01014	(72) Винахідник(и): Марчишин Світлана Михайлівна (UA), Дахим Ірина Степанівна (UA), Луканюк Мар'яна Ігорівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 09.02.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.08.2015	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО" МОЗ УКРАЇНИ", Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2015, Бюл.№ 15	

(54) ОТРИМАННЯ РОСЛИННОЇ СУБСТАНЦІЇ З ВІДХАРКУВАЛЬНОЮ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ

(57) Реферат:

Спосіб одержання рослинної субстанції з відхаркувальною та протизапальною активністю шляхом екстракції біологічно активних речовин 70 % етиловим спиртом із рослинної сировини трави стокроток багаторічних. Одержаний спиртовий екстракт відфільтровують крізь паперовий фільтр під вакуумом і згущують до густого залишку. Шрот екстрагують гарячою водою, водний витяг відфільтровують крізь паперовий фільтр під вакуумом, згущують. Згущені спиртовий і водний екстракти об'єднують і випарюють до максимально густого.

UA 100731 U

Корисна модель належить до фармації, зокрема до способів одержання фармакологічно активної субстанції з лікарської рослинної сировини, а саме з трави стокроток багаторічних (*Bellis perennis* L.), комплексу полісахаридів та сапонінів із відхаркувальною дією, поліфенольного комплексу з протизапальною активністю, які можна використати як активні діючі речовини лікарських засобів із відхаркувальною та протизапальною дією.

Відомий спосіб одержання сиропу коренів алтеї лікарської з відхаркувальною активністю, який включає технологічний етап екстрагування [1].

Недоліком відомого способу є недостатній рівень технологічності, що впливає із обмеження його лише станом водного екстрагування, в силу чого 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 відхаркувальною та протизапальною активністю шляхом спиртово-водного екстрагування з рослинної сировини трави стокроток багаторічних сапогенінів, сапонінів та полісахаридів, які мають відхаркувальною дію. Крім цього, відбувається екстрагування фенольних сполук (гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, дубильних речовин, простих фенолів), що проявляють протизапальний ефект.

При вирішенні технічної задачі були взяті до уваги результати попередніх досліджень, які показали, що трава стокроток багаторічних містить біологічно активні речовини: флавоноїди, дубильні речовини, прості феноли, гідроксикоричні кислоти, органічні кислоти, ефірні олії, які характеризуються протизапальними властивостями, полісахариди та сапоніни - відхаркувальними, а отриманий густий екстракт трави стокроток багаторічних є перспективним для використання як відхаркувального та протизапального засобу [2, 3].

Виходячи з наведеного, одержання фармакологічно активної субстанції із трави стокроток багаторічних (*Bellis perennis* L.) проводять екстракцією біологічно активних речовин 70 % спиртом етиловим, одержаний спиртовий екстракт відфільтровують крізь паперовий фільтр під вакуумом і згущують до густого залишку, шрот екстрагують гарячою водою, водний витяг відфільтровують крізь паперовий фільтр під вакуумом, згущують. Згущені спиртовий і водний екстракти об'єднують і випарюють до максимально густого.

Спосіб здійснюють наступним чином. Повітряно-суху сировину (трава стокроток багаторічних) подрібнюють до розміру часток, що проходять крізь сито з діаметром отвору № 2800 і заливають 70 % спиртом етиловим до дзеркала з урахуванням коефіцієнта водопоглинання сировини. Сировину екстрагують протягом 24 год. при кімнатній температурі. Далі сировину відфільтровують крізь вакуумний фільтр. Отриманий фільтрат упарюють на вакуумному випаровувачі при температурі 60-70 °С до густого. Сировину заливають гарячою водою у співвідношенні 1:10 і екстрагують на водяній бані протягом 2 год. Сировину відфільтровують крізь вакуумний фільтр і повторюють екстракцію ще 2 рази по 30 хв. Водні екстракти об'єднують і упарюють до густого на водяній бані у фарфоровій чашці. Згущені спиртовий і водний екстракти об'єднують і випарюють до максимально густого.

Приклад 1.

170 г трави стокроток багаторічних подрібнених до розміру часток, що проходять крізь сито з діаметром отвору № 2800 заливали 70 % спиртом етиловим до дзеркала. Сировину екстрагували протягом 24 год. при кімнатній температурі. Далі сировину відфільтровували крізь вакуумний фільтр. Отриманий фільтрат упарювали на вакуумному випаровувачі при температурі 60-70 °С до густого. Сировину заливали гарячою водою у співвідношенні 1:10 і екстрагували на водяній бані протягом 2 год. Сировину відфільтровували крізь вакуумний фільтр і повторювали екстракцію 2 рази по 30 хв. Водні екстракти об'єднували і упарювали до густого на водяній бані у фарфоровій чашці. Згущені спиртовий і водний екстракти об'єднували і випарювали до максимально густого.

Отриманий екстракт стокроток багаторічних (ЕСБ) - це густий розчин темно-зеленого кольору, із солодкуватим смаком та приємним специфічним запахом.

Приклад 2.

Дослідження відхаркувальної дії густого, екстракту з трави стокроток багаторічних проводили на білих мишах-самцях масою 20-24 г, яких поділили на 5 груп: 1 група - інтактний контроль, 2, 3 та 4 групи - тварини, яким вводили густий екстракт стокроток у дозах 50, 100 та 150 мг/кг відповідно, 5 група - миші, яким вводили препарат порівняння - сироп "Геделікс" із розрахунку 100 мг/кг екстракту плюща. Досліджувані речовини вводили перорально, контрольна група отримувала фізіологічний розчин натрію хлориду. Через 30 хв. тваринам внутрішньоочередово вводили 500 мг/кг фенолового червоного (феноловий червоний розчиняли в 1-2 краплях диметил сульфоксиду та доводили фізіологічним розчином до

необхідного об'єму). Через 30 хв. тварин виводили з експерименту шляхом дислокації хребців у шийному відділі, знекровлювали шляхом розтину черевної аорти і виконували резекцію всієї трахеї. Отриману трахею вміщували в 4 мл фізіологічного розчину і промивали протягом 30 хв., потім центрифугували при 8000 об./хв. при кімнатній температурі протягом 10 хв., додавали 1 Н розчин натрію гідроксиду до супернатанту (0,1 мл 1 Н NaOH на 1 мл супернатанту), після чого вимірювали поглинання при 546 нм за допомогою спектрофотометра (Helios у) для визначення відхаркувальної активності за концентрацією фенолового червоного.

Відхаркувальну дію досліджуваного екстракту та препарату порівняння - сиропу "Геделікс" також вивчали за їх впливом на активність моторики війчастого епітелію [5, 6]. Цей показник характеризує евакуаторну спроможність секрету бронхів.

Активність війок епітелію зберігається протягом декількох годин після ізоляції трахеї, що є основою в постановці експериментів *in vitro* на початковому етапі відбору активаторів транспортної функції епітелію.

Дослідження відхаркувального ефекту проводили на моделі ізолюваної трахеї щура. Щурів масою 250-280 г забивали кровопусканням з черевної аорти. Трахею звільняли від прилеглих тканин, відсікали між гортанню та її біфуркацією і фіксували до пластинки розміром 9 см × 3,7 см × 0,3 см. Потім пластинку вміщували в пластиковий бокс ємністю 350 мл з 250 мл розчину Тіроде і розміщували на 1 см нижче рівня розчину. Розчин Тіроде сатурували карбогеном з підтриманням постійної температури 37 °С. Активність війок трахеї визначали шляхом підрахунку часу просування макових зернят, які були розташовані на протилежному до гортані краю слизової трахеї, на відстань 5 мм. Базову активність війок визначали в 7 спостереженнях з використанням збільшення (×20) [5, 6]. Досліджувані сполуки добавляли до розчину Тіроде, де знаходилась трахея.

Обробка результатів виконана у відділі системних статистичних досліджень ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України" в програмному пакеті Statsoft STATISTICA.

Результати впливу стокроток екстракту густого на секреторну функцію бронхів наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Вплив густого екстракту стокроток багаторічних культивованих на секреторну функцію бронхів

Групи тварин (n=7)	Доза, мг/кг	Оптична густина, од. опт. щіл.	Здатність секретувати мокроту, %
Контроль		0,24±0,06	100 %
Стокроток екстракт густий	50 мг/кг	0,22±0,01#	91,5 %
Стокроток екстракт густий	100 мг/кг	0,28±0,01*#	116,8 %
Стокроток екстракт густий	150 мг/кг	0,36±0,01*	147,2 %
Сироп "Геделікс" (екстракт плюща)	100 мг/кг	0,37±0,01*	151,7 %

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності (p<0,05) відносно контролю

2. # - вірогідні відмінності (p<0,05) відносно сиропу "Геделікс"

Результати досліджень показали, що екстракт стокроток має високу здатність секретувати мокроту, яка практично не поступається здатності препарату порівняння - сиропу "Геделікс" (екстракт плюща) - 147,2 % і 151,7 % відповідно (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив екстракту трави стокроток багаторічних на час просування макових зернят по війчастому епітелію трахеї щурів

Групи тварин (n=7)	Доза, мг на 250 мл інкубаційної суміші	Час просування макового зернятка по війчастому епітелію трахеї щура, хв.
Контроль (розчин Тіроде)		22,30±0,59
Стокроток екстракт густий	100	18,30±1,17*# (17,9 %)
Стокроток екстракт густий	150	15,50±1,67* (30,5 %)
Сироп "Геделікс" (екстракт плюща)	100	13,70±1,29* (38,6 %)

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності (p<0,05) відносно контролю
2. # - вірогідні відмінності (p<0,05) відносно сиропу "Геделікс"

У результаті експерименту встановлено, що найбільшу активність в зменшенні часу просування макових зернят по війчастому епітелію трахеї щурів проявив сироп "Геделікс" у дозі 100 мг у перерахунку на екстракт плюща. Відхаркувальна активність густого екстракту трави стокроток культивованих у дозі 100 мг/кг по відношенню до контролю становила 17,9 %, у дозі 150 мг/кг -30,5 %, препарату порівняння - 38,6 %.

Приклад 3.

Дослідження протизапальної дії густого екстракту з трави стокроток багаторічних проведені на щурах масою 210-250 г. Використовували наступні групи тварин: 1-ша група тварин - позитивний контроль, 2-5-та групи - тварини, яким попередньо вводили водний розчин густого екстракту стокроток у дозах 25, 50, 100, 150 мг/кг, 6-та група - тварини, яким вводили препарат порівняння - таблетки ортофену у дозі 8 мг/кг. Досліджуваний екстракт і препарат порівняння ортофен вводили внутрішньошлунково за допомогою металевго зонду, одноразово за 45 хв. до моделювання локального запалення. Набряк стопи у щурів викликали введенням 0,1 мл 1 % розчину карагеніну під апоневротичну пластинку правої лапи щурів [4]. Ступінь розвитку набряку оцінювали за збільшенням об'єму лапи, який вимірювали у динаміці до введення карагеніну (вихідні дані) та через 1, 2, 3, 4 та 6 годин після. Товщину лапи вимірювали за допомогою механічного онкометра. Протизапальну активність ГЕС та препарату порівняння визначали за здатністю зменшувати набряк лапи у дослідних тварин у порівнянні з контрольними та виражали у %. Розрахунок протизапальної активності проводили за формулою:

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

де: А - протизапальна активність, %;

ΔV_k та ΔV_d - різниця між вихідним об'ємом лапи та об'ємом набряклої лапи у різні терміни спостереження у контролі та досліді, мм.

Отримані експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою стандартного пакету статистичних програм "Statistica v.6,0". Узагальнені дані з визначення набряку лапи виражали як середнє арифметичне та його стандартну помилку (mean ± St. er). Для отримання статистичних висновків при порівнянні виборок відносних перемінних застосовували однофакторний дисперсійний аналіз та критерій Мана-Уїтні. Відмінності між контрольними та дослідними групами вважали статистично значущими при p<0,05.

Відповідно до отриманих результатів (табл. 3) у тварин групи позитивного контролю набряк був найбільш вираженим на 3-4 годину після ін'єкції флогогенного агенту. Така динаміка розвитку набряку є закономірною, оскільки відомо, що у механізмі розвитку карагенінового набряку поряд із запуском каскаду прозапальних медіаторів та цитокінів, провідним є активація ключового ферменту метаболізму арахідонової кислоти - циклооксигенази 2 (ЦОГ 2). Остання ініціює синтез простагландинів, які викликають запалення, літогенез, клітинну проліферацію та деструкцію, сприяють вивільненню внутрішньоклітинних медіаторів (гістаміну, серотоніну, брадикініну).

Стокроток екстракт густий (СЕГ) виявив виражену антиексудативну дію у всіх досліджуваних дозах (табл. 3), але найбільша активність екстракту спостерігалася у групі тварин, яким вводили

СЕГ у дозі 150 мг/кг. За ефективністю СЕГ у дозі 150 мг/кг не поступався препарату порівняння ортофену. Дещо нижча активність виявлена при застосуванні СЕГ у дозі 25 мг/кг і найменша - у дозах 50 і 100 мг/кг. У середньому протизапальна активність СЕГ на моделі карагенінового набряку у щурів за перші чотири години спостереження склала 63 % у дозі 150 мг/кг, у дозі 25 і 50 мг/кг - 44 % і 42 % відповідно, у дозі 100 мг/кг - 24 %. Загальна активність за всі шість годин була дещо нижчою та склала 55 % і 61 % - у СЕГ у дозі 150 мг/кг та ортофену відповідно, 38 % і 34 % - у СЕГ у дозі 25 і 50 мг/кг відповідно та 20 % у СЕГ у дозі 100 мг/кг.

Отже, за результатами проведеного дослідження можна констатувати виразну протизапальну активність стокроток екстракту густого, що обумовлює перспективність подальших фармакологічних досліджень.

Таким чином, запропонований спосіб забезпечує отримання біологічно активних речовин з трави стокроток багаторічних у вигляді густого екстракту із виразною відхаркувальною та протизапальною активністю і може бути використаний у промисловому виробництві лікарських препаратів на основі рослинної сировини як засіб із відхаркувальною та протизапальною дією.

Таблиця 3

Вплив густого екстракту стокроток у дозах 25-150 мг/кг на розвиток карагенінового набряку лапи у щурів (1 % розчин карагеніну по 0,1 мл/тварину, n=6)

Групи тварин	Термін спостереження							
	1 год.	2 год.	3 год.	4 год.	ПЗА за 4 год., %	5 год. ПЗА, %	6 год.	ПЗА за 6 год., %
Позитивний контроль	14,8±1,5	15,7±1,8	17,3±2,0	21,2±2,4	-	16,3±1,7	14,5±2,3	-
ГЕС, 25 мг/кг	5,8±2,4*	9,5±2,3#	9,5±2,3*	14,5±1,7	44	12,3±3,1	11,2±2,7	37
ГЕС, 50 мг/кг	7,4±1,2*	10,4±2,5#**	9,2±2,9	13,4±3,3	42	11,0±2,0 33	14,0±0,8	34
ГЕС, 100 мг/кг	9,2±1,0*	12,7±2,7#**	14,5±3,5#**	16,8±2,9	24	13,8±2,5 15	13,3±2,3	20
ГЕС, 150 мг/кг	6,8±1,0*	3,3±0,8 */**	5,8±1,1*	9,7±2,2*	63	10,2±3,7	9,2±3,9	55
Ортофен, 8 мг/кг	4,2±1,3	2,8±1,0*	4,3±1,4*	7,5±1,4*	73	10,5±1,5	9,3±1,2	61

Примітки:

1. * - відмінності достовірні щодо значень позитивного контролю, $p < 0,05$;
2. # - відмінності достовірні щодо значень тварин, яким вводили препарат порівняння, ортофен у дозі 8 мг/кг, $p < 0,05$;
3. ** - відмінності достовірні щодо значень тварин, яким вводили ГЕС у дозі 150 мг/кг, $p < 0,05$;
4. n - кількість тварин у кожній групі.

Джерела інформації:

1. Пат. 49852 У. Україна, МПК А61К 36/00 (2009). Спосіб одержання сиропу кореня алтею лікарського / В.В. Дячок, М.С. Мальований - № U200912710; заявл. 07.12.2009; опубл. 11.05.2010, бюл. № 9.

2. Гусак Л. Визначення вмісту гідроксикоричних кислот та фенольних сполук у траві стокроток багаторічних / Л. Гусак, І. Дахим // XVII Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених, 22-24 квітня 2013 р.: матеріали конгресу. – Тернопіль. - 2013. - С. 301.

3. Дахим І.С. Хімічний склад трави стокроток багаторічних (*Bellis perennis* L.) / І.С. Дахим, С.М. Марчишин // Здобутки клінічної та експериментальної медицини – Тернопіль. - 2014. - № 1 (20). – С. 35-38.

4. Експериментальне (доклінічне) вивчення фармакологічних речовин, які пропонуються як нестероїдні протизапальні засоби. У кн.: Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / С.М. Дроговоз, І.А.Зупанець, М.А. Мохорт та ін. // За редакцією член.-кор. АМН України О.В. Стефанова. - К.: Авіцена. - 2001. - С. 292-306.

5. Марчишин С.М. Дослідження відхаркувальної активності густого екстракту стокроток / С.М. Марчишин, І.С. Дахим, М.С. Гарник // Фармацевтичний часопис - 2014. - № 3 (31). – С. 82-84.

6. Сернов Л.Н. Элементы экспериментальной фармакологии / Л.Н. Сернов, В.В. Гацура. - М., 2000. - С.79.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Спосіб одержання рослинної субстанції з відхаркувальною та протизапальною активністю, що включає технологічний етап екстрагування, який **відрізняється** тим, що екстракцію біологічно активних речовин проводять 70 % етиловим спиртом із рослинної сировини трави стокроток багаторічних, одержаний спиртовий екстракт відфільтровують крізь паперовий фільтр під вакуумом і згущують до густого залишку, шрот екстрагують гарячою водою, водний витяг відфільтровують крізь паперовий фільтр під вакуумом, згущують, згущені спиртовий і водний екстракти об'єднують і випарюють до максимально густого.

10

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601