



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **100754** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)

A61K 36/48 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 1/18 (2006.01)

A61P 29/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2011 01352**

(22) Дата подання заявки: **07.02.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **25.01.2013**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **10.08.2012, Бюл.№ 15**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.01.2013, Бюл.№ 2**

(72) Винахідник(и):

**Романова Світлана Вікторівна (UA),
Ковальов Володимир Миколайович (UA),
Ковальов Сергій Володимирович (UA),
Грицик Андрій Романович (UA),
Кравченко Віра Миколаївна (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

Смик Г.К. Корисні та рідкісні рослини
України. - К.: «Українська Радянська
енциклопедія» імені М.П. Бажана, 1991. -
с.159, 290.

US 5762936 A, 09.06.1998.

RU 2269898 C1, 20.02.2006.

RU 2278524 C1, 27.06.2006

UA 73209 C2, 15.06.2005.

UA 56038 U, 27.12.2010.

UA 15745 U, 17.07.2006.

SU 1497634 A1, 30.07.1989.

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З
ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЮ, АНАЛЬГЕТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ ТА РЕГЕНЕРУЮЧОЮ ДІЄЮ НА
ПІДШЛУНКОВУ ЗАЛОЗУ**

(57) Реферат:

Винахід належить до фармації та медицини, а саме до способів одержання засобів рослинного походження, зокрема комплексу біологічно активних речовин з гепатопротекторною, анальгетичною активністю та регенеруючою дією на підшлункову залозу, який може бути використаний як активна субстанція при створенні лікарських препаратів для лікування та профілактики захворювань гепатобіліарної системи. У способі одержання комплексу біологічно активних речовин з гепатопротекторною, анальгетичною активністю та регенеруючою дією на підшлункову залозу проводять трикратну екстракцію подрібненої рослинної сировини водою при температурі 95-100 °С з подальшим об'єднанням відфільтрованих екстрактів, упарюванням та сушінням, згідно з винаходом передбачено, що як рослинну сировину використовують траву сочевиці харчової (*Lens culinaris* M.), першу екстракцію проводять при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 протягом 2,0 годин, другу і третю -1:9 протягом 1,0 години з подальшим упарюванням екстракту до сухого залишку.

UA 100754 C2

Винахід належить до фармації та медицини, а саме до способів одержання комплексів біологічно активних речовин з рослинної сировини з подальшим їх використанням як лікарських субстанцій при створенні препаратів у різних лікарських формах.

На сучасному етапі розвитку медицини актуальним є створення високоефективних рослинних лікарських засобів для лікування захворювань гепатобіліарної системи. Перевага фітопрепаратів полягає в безпечності при тривалому застосуванні та мінімумі побічних та алергічних реакцій. Тому важливим є дослідження лікарських рослин, які проявляють гепатопротекторну, анальгетичну та регенеруючу дію на підшлункову залозу при розвитку запального процесу підшлункової залози.

Відомий спосіб отримання засобу з гепатопротекторною активністю [1] шляхом триразової екстракції по 12 годин листя винограду 39-41% етанолом при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:12.

До недоліків відомого способу можна віднести його довготривалість (36 год.) та суттєві витрати спирту етилового. Наведений спосіб також не дозволяє одержати засіб з додатковою анальгетичною активністю та регенеруючою дією на підшлункову залозу.

Відомий спосіб одержання засобу з протизапальною, анальгетичною та діуретичною активністю [2], що полягає в триразовій екстракції листя тополі китайської 49-51 % етанолом при загальному співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 з подальшим об'єднанням одержаних екстрактів, відстоюванням при температурі від +5 °C до +10 °C протягом 24-48 годин та упарюванням до отримання сухого продукту.

Наведений спосіб відзначається тривалістю і витратами спирту етилового високої концентрації і також не забезпечує одержання засобу, який поєднує анальгетичну дію з гепатопротекторною активністю та регенеруючою дією на підшлункову залозу.

За прототип вибрано спосіб виділення фенольного комплексу біологічно активних речовин з кори осики, які виявляють поряд з анальгетичною антимікробну, репаративну, протизапальну та діуретичну дію [3]. Згідно з відомим способом знежирену суху сировину тричі екстрагують протягом 30 хвилин гарячою водою на киплячому водяному огрівнику при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10. Отримані водні екстракти об'єднують і упарюють до сухого стану. Вихід фенольного комплексу складає 10,3 %.

Недоліком відомого способу за прототипом можна вважати недостатньо високий вихід готового продукту та відсутність у одержаного засобу гепатопротекторної активності та регенеруючої дії на підшлункову залозу.

Задачею винаходу є створення способу одержання комплексу біологічно активних речовин (БАР) з гепатопротекторною, анальгетичною активністю та регенеруючою дією на підшлункову залозу, який завдяки використанню як сировини трави сочевиці харчової і проведення процесу при заданих параметрах забезпечує одержання ефективного засобу у формі сухого 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 способі одержання комплексу біологічно активних речовин з гепатопротекторною, анальгетичною активністю та регенеруючою дією на підшлункову залозу шляхом трикратної екстракції подрібненої рослинної сировини водою при температурі 95-100 °C з подальшим об'єднанням відфільтрованих екстрактів, їх упарюванням та сушінням, згідно з винаходом передбачено, що як рослинну сировину використовують траву сочевиці харчової (*Lens culinaris* M.), першу екстракцію здійснюють при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 протягом 2-х годин, а другу і третю - при співвідношенні 1:9 протягом 1 години.

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

Сочевиця харчова (*Lens culinaris* M.) - однорічна рослина, яка широко культивується на території України. Вирощують її заради насіння, яке містить велику кількість білка [4]. У народній медицині використовують насіння сочевиці, проте застосування трави сочевиці для одержання засобу для лікування захворювань гепатобіліарної системи невідоме з джерел інформації.

Авторами вперше запропоновано використання трави сочевиці харчової для одержання комплексу біологічно активних сполук з гепатопротекторною, анальгетичною активністю та регенеруючою дією на підшлункову залозу.

Експериментально встановлено, що використання як екстрагенту гарячої води при одержанні комплексу біологічно активних речовин з трави сочевиці харчової забезпечує їх

найбільш повну екстракцію. Варіанти дослідів з використанням як екстрагенту води та спирту етилового різної концентрації представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

Вибір екстрагенту за кількісним виходом екстрактивних речовин

Екстрагент	вода	30 % етанол	50 % етанол	70 % етанол	96 % етанол
Кількісний вихід екстрактивних речовин, %	39,30	35,50	30,60	28,70	21,45

5 Передбачене заявленим способом підвищення температури води до 95-100 °C і трикратна екстракція сировини новими порціями екстрагенту інтенсифікує процес екстрагування, що дозволяє максимально вилучити БАР із сировини. Крім того, такий екстрагент також вигідний з боку технологічних вимог до здійснення способу, бо є доступним, дешевим та екологічно безпечним.

10 Сумарне співвідношення сировини до екстрагенту 1:28 встановлено експериментально і є оптимальним для вибраної сировини.

Перший етап екстракції здійснюють при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10, а друга і третя екстракція при співвідношенні 1:9. Менша кількість екстрагенту на кожному з етапів не дозволяє ефективно провести екстракцію і створює труднощі технологічного характеру. Більша кількість екстрагенту є нераціональною, тому що необхідна екстракція досягається заявленою кількістю екстрагенту.

Загальна тривалість усіх етапів екстракції складає 4,0 години і є необхідною і достатньою для вичерпного вилучення з сировини комплексу біологічно активних сполук з гепатопротекторною, анальгетичною активністю та регенеруючою дією на підшлункову залозу.

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

Таким чином, використання трави сочевиці при сукупності параметрів заявленого способу дозволяє одержати комплекс біологічно активних сполук з гепатопротекторною, анальгетичною активністю та регенеруючою дією на підшлункову залозу.

Заявлений спосіб є новим, невідомим з джерел інформації.

30 Винахід здійснюється наступним чином. Висушену і подрібнену до розміру часток 2-5 мм траву сочевиці завантажують у реактор з мішалкою і паровою сорочкою, заливають гарячою водою 95-100 °C у співвідношенні сировина:екстрагент 1:10. Екстракцію проводять протягом 2 годин при перемішуванні і постійно витриманій температурі. Процедуру повторюють ще двічі при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:9, з тривалістю кожної екстракції 1 год. Відфільтровані водні витяги об'єднують і упарюють на вакуумно-випарювальному апараті до повного висушування. Сухий екстракт подрібнюють. Вихід готового продукту становить 32,0-34,0 % від повітряно-сухої сировини.

35 Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1.

40 1,2 кг подрібненої повітряно-сухої трави сочевиці завантажували у реактор з мішалкою і паровою сорочкою, заливали 12 л гарячої води 95 °C і перемішували протягом 2 годин при постійно витриманій температурі 95 °C. Екстракцію повторювали двічі, додаючи по 10,8 л води, з тривалістю кожної екстракції 1 год. Одержані екстракти об'єднували і упарювали на вакуумно-випарювальному апараті до повного висушування. Сухий екстракт подрібнювали. Вихід цільового продукту склав 402 г, тобто 33,5 %.

Приклад 2.

45 Гепатопротекторну активність комплексу БАР з трави сочевиці харчової, одержаного за заявленим способом, проводили на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту, який відтворювали шляхом підшкірного введення щурам 50 % олійного розчину тетрахлорметану у дозі 0,8 мл на 0,1 кг маси тварини протягом двох діб з проміжком 24 години [5].

50 Досліди проводили на 24 білих щурах масою 0,21-0,24 кг. Тварини були розділені на 4 групи: перша група - контрольна патологія; тваринам другої і третьої груп на фоні тетрахлорметанового ураження печінки вводили відповідно водні розчини комплексу БАР трави сочевиці харчової і препарат порівняння - біофлавоноїдний гепатопротектор силібор. Комплекс БАР з трави сочевиці і препарат порівняння силібор вводили тваринам за 1 год. до і через 2 год.

після введення тетрахлорметану. Вивчення біохімічних та функціональних показників стану печінки проводили через 24 год. Після останнього введення тетрахлорметану.

Результати біохімічних показників стану печінки дослідних тварин наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Вплив комплексу БАР трави сочевиці харчової, одержаного за заявленим способом, на біохімічні показники стану печінки тварин при гострому токсичному гепатиті

Група тварин	Об'єкт дослідження	Кількість тварин	Доза, мг/1,0 кг	Еритроцити, $\times 10^{12}/л$	Лейкоцити, $\times 10^9/л$	Гемоглобін, г/л	АсАТ, мкмоль/год. мл	АлАТ, мкмоль/год. мл
1	50 % олійний р-н CCl_4	6	0,8 мл	$6,04 \pm 0,3$	$17,97 \pm 0,10$	$111 \pm 4,5$	$0,96 \pm 0,03$	$1,14 \pm 0,02$
2	Комплекс БАР з трави сочевиці	6	25	$6,40 \pm 0,3$	$15,0 \pm 0,20$	$124 \pm 1,5$	$0,54 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,03$
3	Силібор	6	25	$7,24 \pm 0,21$	$12,21 \pm 0,10$	$130 \pm 3,0$	$0,48 \pm 0,03$	$0,59 \pm 0,02$
4	Інтактні тварини	6	—	$7,44 \pm 0,25$	$12,98 \pm 0,06$	$135 \pm 4,0$	$0,40 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,03$

5

Інтенсивність ураження клітинних мембран печінки оцінювали за рівнем активності трансаміназ - аланінамінотрансферази (АлАТ) та аспартатамінотрансферази (АсАТ). Активність трансаміназ визначали уніфікованим динітрофенілгідразинним методом за допомогою стандартного набору реактивів фірми ЗАО "ДИАКОНТ-ДС". Рівень гемоглобіну, число еритроцитів і лейкоцитів визначали за загальноприйнятими методиками.

10

Результати досліджень (табл.2) показали, що введення тваринам тетрахлорметану приводить до ураження печінки, про що свідчить порушення активності АлАТ, АсАТ. Рівень цих показників зростає у 2,0 і 2,4 рази відповідно у порівнянні з інтактними тваринами.

15

Однчасне введення тетрахлорметану та комплексу БАР трави сочевиці дозволило встановити суттєве зниження активності АлАТ і АсАТ. Підтвердженням цих властивостей є чітко виражена спрямованість до нормалізації активності вивчених ферментів у тварин другої групи (активність АлАТ в сироватці крові знизилась в 1,8 рази; АсАТ - в 1,7 рази) у порівнянні з першою групою тварин. В цій групі тварин спостерігалось зростання числа еритроцитів і рівня гемоглобіну у порівнянні до тварин контрольної групи.

20

Наведені результати свідчать, що застосування комплексу БАР трави сочевиці при гострому токсичному ураженні печінки значно зменшує токсичну дію тетрахлорметану, забезпечуючи гепатозахисну дію.

25

Таким чином, комплекс БАР трави сочевиці харчової, одержаний згідно заявленого винаходу, проявляє при токсичних ураженнях печінки гепатопротекторну активність, яка практично не поступається гепатопротекторній дії препарату порівняння силібору.

Приклад 3.

30

Регенеруючу дію комплексу БАР з трави сочевиці харчової, одержаного за заявленим способом, на підшлункову залозу вивчали на моделі гострого панкреатиту [6]. Досліди проводили на білих щурах масою 0,18-0,22 кг, розділених на 3 групи: дослідна, контрольна, інтактні тварини. Для відтворення гострого панкреатиту тваринам першої та другої груп після 12-годинного голодування вводили перорально тваринний жир в дозі 10,0 г та алкоголь в дозі 1,6 г на 1,0 кг маси тварини, після чого тваринам на 3 години створювали іммобілізаційно-холодовий стрес. Через 24 год. після іммобілізаційно-холодового стресу у тварин контрольної групи морфологічно підтверджено ознаки гострого вогнищового панкреатиту. Тваринам дослідної групи протягом 14 діб після відтворення гострого панкреатиту вводили інтраабдомінально водний розчин комплексу БАР трави сочевиці харчової, одержаного за заявленим способом, в дозі 50 мг на 1,0 кг маси тварини. Третя група - інтактні тварини.

35

Через 14 діб з моменту першого введення тваринного жиру та алкоголю тварин декапітували (під ефірним наркозом). Висновок про регенеруючий вплив на підшлункову залозу досліджуваного екстракту робили на основі біохімічних показників крові підшлункової залози. Вміст глюкози в крові визначали за допомогою аналізатора глюкози АГКМ-01, активність α -амілази - автоматичного аналізатора ACCENT-200 з використанням реактивів фірми PZ CORMAY S.A. (Польща).

40

Результати біохімічних показників крові дослідних тварин представлені у табл. 3.

Таблиця 3

Біохімічні показники крові підшлункової залози дослідних тварин

Група тварин	Об'єкт дослідження	Кількість тварин	Глюкоза, ммоль/л	Амілаза, од/л
1	Комплекс БАР з трави сочевиці харчової	6	7,22±0,19	183,95±7,72
2	Контроль	6	10,28±0,18	328,70±10,12
3	Інтактні тварини	6	5,08±0,09	78,01±3,10

Дані таблиці 3 свідчать про те, що одночасне введення тваринного жиру, алкоголю і досліджуваного екстракту знижує вміст глюкози в крові і активність амілази, доводячи вказані показники до рівня інтактних тварин, тобто комплекс БАР з трави сочевиці знижує в умовах гострого експериментального панкреатиту вміст глюкози в крові (у 1,42 рази) та активність амілази крові (у 1,79 рази) у порівнянні з контрольною групою.

Для підтвердження регенеруючої дії на підшлункову залозу комплексу БАР трави сочевиці харчової, одержаного за заявленим способом, проводили порівняння гістоморфологічного дослідження змін у тканині підшлункової залози. Для патогістологічного дослідження проводили забір підшлункової залози, шматочки якої фіксували у нейтральному 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.

При вивченні гістологічних препаратів тварин другої групи (контроль) морфологічно спостерігалися деструкція та некроз паренхіми підшлункової залози, декомплексація ацинарної частини, порушення часточкової будови, виражений набряк, масивні просякання еритроцитами (свіжі та вилужені), вогнища некрозів, інфільтрація тканини поліморфноядерними запальними клітинами, як в паренхімі, так і по ходу судин, вивідних протоків у стромі. Ближче до периферії ацинарної частини залози спостерігалися виражені некрози паренхіми та жирові некрози з формуванням абсцедуючих порожнин та секвестрів. У тварин другої групи морфологічно підтверджено гострий геморагічно-гнійний панкреатит з явищами панкреонекрозу.

Для інтактних тварин (третя група) тканина підшлункової залози часточкової будови, ацинарна та острівкова частини диференціюються чітко, помірно повнокров'я. Міжчасточкові і внутрішньочасточкові сполучнотканинні перегородки розвинені, екзокринні ацинуси сформовані в достатній кількості. Міжчасточкові вивідні протоки звивисті, не поширені. Панкреатичні островки контуруються чітко, не деформовані, повнокровні. Кровоносні судини повнокровні. Гістологічна будова підшлункової залози відповідає нормі.

У тварин дослідної групи спостерігався набряк стоми, з частковим здавленням острівців Лангерганса, повнокров'я судин, розширення протоків, при цьому збережена дольчата будова ацинарної частини та острівкового апарату залози.

Результати проведених досліджень свідчать, що досліджуваний комплекс БАР з трави сочевиці харчової при гострому експериментальному панкреатиті проявляє регенеруючу дію на підшлункову залозу на клітинному рівні.

Приклад 4.

Анальгетичну активність комплексу БАР трави сочевиці, одержаного за заявленим способом, вивчали на моделі "оцтовокислих корчів" на білих щурах масою 0,15-0,18 кг, які були розподілені на 6 груп: дослідні; ті, яких лікували досліджуваним екстрактом у дозах 50, 100, 150, 200 мг/кг; ті, яких лікували препаратом порівняння анальгіном, і контрольні. Анальгетичну активність оцінювали за здатністю зменшувати кількість "оцтовокислих корчів" і виражали у відсотках [5].

Розрахунок проводили за формулою:

$$AA = \frac{(C_K - C_D) \cdot 100}{C_K};$$

де: AA - анальгетична активність,

C_K і C_D - середня кількість корчів у тварин контрольної і дослідної групи.

Результати дослідів наведені у таблиці 4.

Таблиця 4

Анальгетична активність комплексу БАР трави сочевиці харчової, одержаного за заявленим способом

Варіанти досліджу		Кількість корчів, М±m	Активність, %
Контроль		23±2,13	-
Анальгін, 55 мг/кг		10±0,88	58*
Комплекс БАР з трави сочевиці харчової	50 мг/кг	12,5±1,94	46
	100 мг/кг	13±2,19	43
	150 мг/кг	12±3,26	48
	200 мг/кг	9±1,17	61*

Примітка: * - різниця достовірна у порівнянні з контрольною групою тварин (P < 0,05).

За даними таблиці 4 комплекс БАР з трави сочевиці у дозі 200 мг/кг виявляє анальгетичну активність (61 %) на рівні з препаратом порівняння анальгіном (58 %). У дозі 50 мг/кг комплекс БАР виявляє активність 46 %, в дозі 100 мг/кг - 43 % і в дозі 150 мг/кг - 48 %, тобто простежується залежність «доза-ефект».

Таким чином, заявлено спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з вираженою гепатопротекторною, анальгетичною активністю та регенеруючою дією на підшлункову залозу, який є перспективним для використання як лікарської субстанції при створенні лікарських препаратів для лікування гепатобіліарної системи.

Заявлений спосіб є економічним, екологічно безпечним та може бути здійснений в умовах промислового виробництва з використанням стандартного обладнання.

Джерела інформації

1. Патент на корисну модель 15745, Україна, МПК(2006) А61К36/00, заявл.16.01.2006, опубл.17.07.2006, Бюл. №7.

2. Патент на корисну модель 56038, Україна, МПК(2006) А61К36/76 (2006.01), А61К127/00 (2006.01), заявл. 25.05.2010, опубл. 27.12.2010, Бюл. №24.

3. Патент на винахід 73209, Україна, МПК А61К35/78, заявл. 19.05.2003, опубл. 15.06.2005, Бюл.№6.

4. Смик Г.К. Корисні та рідкісні рослини України. - К.: «Українська Радянська енциклопедія» імені М.П. Бажана, 1991. - 416 с

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

6. Патент на изобретение № 01497634, RU. Способ моделирования острого панкреатита / Герелюк И.П., Збирок Н. П., Горбачевский Б.П., Збирок И.Н. Опубл. 30.07.1989.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

Спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з гепатопротекторною, анальгетичною активністю та регенеруючою дією на підшлункову залозу шляхом трикратної екстракції подрібненої рослинної сировини водою при температурі 95-100 °С з подальшим об'єднанням відфільтрованих екстрактів, їх упарюванням та сушінням, який **відрізняється** тим, що як рослинну сировину використовують траву сочевиці харчової (*Lens culinaris* М.), першу екстракцію проводять при співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 протягом 2,0 годин, другу і третю - при співвідношенні 1:9 протягом 1,0 години.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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