



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 93512

(13) U

(51) МПК

A61K 36/28 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: u 2014 02606	(72) Винахідник(и): Марчишин Світлана Михайлівна (UA), Козир Галина Романівна (UA), Бердей Тетяна Степанівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 14.03.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.10.2014	(73) Власник(и): Марчишин Світлана Михайлівна, вул. Весела, 23, м. Тернопіль, 46002 (UA), Козир Галина Романівна, вул. Стуса, 25, с. Підгороднє, Тернопільський р-н, 47001 (UA), Бердей Тетяна Степанівна, вул. Руська, 36, м. Тернопіль, 46001 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.10.2014, Бюл.№ 19	

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ РОСЛИННОЇ СУБСТАНЦІЇ З ЖОВЧОГІННОЮ ТА ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЮ АКТИВНІСТЮ**(57) Реферат:**

Спосіб отримання рослинної субстанції з жовчогінною та гепатопротекторною активністю, включає етап екстрагування, фільтрації та упарювання подрібненої рослинної сировини. Як рослинну сировину використовують суху траву чорнобривців, яку заливають спиртом етиловим до утворення "дзеркала" на поверхні. Екстрагують при кімнатній температурі, фільтрують через вакуумний фільтр. Отриманий фільтрат упарюють до густого залишку, а шрот заливають гарячою водою і екстрагують на водяній бані, відфільтровують, з наступним дворазовим екстрагуванням фільтрату кожного разу. Потім водні фільтрати об'єднують та упарюють до одержання густого залишку. Після цього густі спиртовий і водний залишки об'єднують та висушують.

UA 93512 U

Корисна модель належить фармації, а саме способів отримання екстракційних препаратів з лікарської рослинної сировини, що характеризуються жовчогінною та гепатопротекторною активністю, і може бути використана у медицині для лікування хворих із захворюваннями печінки.

Відомий спосіб отримання рослинної субстанції з жовчогінною та гепатопротекторною активністю з сухої трави гороху посівного [1]. За відомим способом подрібнену рослинну сировину трави гороху посівного екстрагують 10-кратною кількістю 49-51 % етилового спирту протягом 11-12 годин з подальшим упарюванням екстракту до водного залишку з наступним очищенням від речовин ліпофільної природи хлористим метиленом, при співвідношенні 3:4 водного залишку до хлористого метилену, з подальшим сушінням водного залишку до сухого.

Недоліком відомого способу є недостатня фармакологічна активність, тобто одержаний засіб характеризується вузькоспрямованою фармакологічною дією, а сам технологічний процес потребує надмірних затрат, зокрема на використання розчинника хлористого метилену.

Відомий спосіб отримання рослинної субстанції з жовчогінною та гепатопротекторною активністю [2]. За відомим способом субстанцію отримують шляхом трикратної екстракції листя винограду 39-41 % етанолом при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:12, причому тривалість кожної екстракції складає 12 годин. Загальна тривалість здійснення усього технологічного процесу отримання субстанції складає 36 годин.

Недоліком відомого способу є недостатня фармакологічна активність, довготривалість та висока вартість способу в цілому із-за суттєвих витрат на використання розчинника спирту етилового. Отриманий засіб за відомим способом характеризується лише гепатопротекторною властивістю.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалити відомий спосіб, в якому шляхом зміни технологічного прийому, спрямованого на одержання нового високо ефективного засобу, як для профілактики, так і для лікування хворих із захворюваннями печінки у формі рослинного екстракту з максимально збереженим у ньому комплексом біологічно активних речовин (БАР), який характеризується яскраво вираженою гепатопротекторною та жовчогінною дією, досягають не тільки розширення фармакологічної активності лікарського засобу, але і суттєвого зниження енергозбереження та ресурсозбереження способу в цілому.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб отримання рослинної субстанції з жовчогінною та гепатопротекторною активністю, що включає етап екстрагування, фільтрації та упарювання подрібненої рослинної сировини, згідно з корисною моделлю, як рослинну сировину використовують суху траву чорнобривців, яку заливають 70 % спиртом етиловим до утворення "дзеркала" на поверхні, екстрагують протягом 24 год. при кімнатній температурі, фільтрують через вакуумний фільтр, отриманий фільтрат упарюють до густого залишку, а шрот заливають гарячою водою у співвідношенні 1:10 і екстрагують на водяній бані протягом 2 год., відфільтровують, з наступним дворазовим екстрагуванням фільтрату тривалістю 30-40 хв. кожного разу, потім водні фільтрати об'єднують та упарюють до одержання густого залишку, після чого густі спиртовий і водний залишки об'єднують та висушують.

Захворювання печінки займають значне місце серед цілого ряду нозологічних форм уражень печінки. Це обумовлено погіршенням екологічного стану, ураженнями печінки при гострих отруєннях (у тому числі зловживання алкоголем, харчові отруєння) та медикаментозним впливом тощо. Зміни у біохімічних процесах, що протікають в організмі, відображаються на її жовчоутворюючій функції, тобто на кількості та якості жовчі, що виробляється печінкою, вивчення останньої є важливим критерієм пошуку нових жовчогінних та гепатопротекторних засобів для лікування та профілактики захворювань біліарної системи.

У зв'язку з цим, постає необхідність створення гепатопротекторних препаратів, які б володіли достатньо вираженою лікувально-профілактичною дією і одночасно не спричиняли негативного впливу на організм при довготривалому їх використанні. Саме тому, інтерес представляють такі рослинні екстракти, які характеризуються вмістом широкого спектра біологічно активних речовин.

Запропонована нами рослинна субстанція з жовчогінною та гепатопротекторною активністю, отримана з трави чорнобривців, завдяки використанню саме цієї трави як сировини, що забезпечує специфічну дію як на печінку, так і на весь організм у цілому являє собою якісно новий лікарський засіб з яскраво вираженою фармакологічною активністю.

Спосіб отримання рослинної субстанції з жовчогінною та гепатопротекторною активністю здійснюють наступним чином.

Подрібненої сухої рослинної сировини трави чорнобривців заливають 70 % спиртом етиловим до утворення "дзеркала" на поверхні та екстрагують протягом 24 год. при кімнатній температурі. Потім фільтрують через вакуумний фільтр, відділивши фільтрат від шроту. Одержаний фільтрат

упарюють до густого залишку, а шрот заливають гарячою водою у співвідношенні 1:10 і піддають екстракції на водяній бані протягом 2 год. з наступним фільтруванням та дворазовим екстрагуванням фільтрату тривалістю 30-40 хв. кожного разу. Водні фільтрати об'єднують та упарюють до одержання густого залишку. Отримані густі спиртовий і водний залишки об'єднують та висушують за допомогою вакуумної сушарки.

Приклад 1

Повітряно-суху рослинну сировину трави чорнобривців вагою 338 г подрібнили до такого розміру часток, які проходили через сито з діаметром отворів 5 мм і залили 70 % спиртом етиловим та настояли до утворення "дзеркала" на поверхні з наступним екстрагуванням протягом 24 год. при кімнатній температурі. Потім відфільтрували через вакуумний фільтр. Отриманий фільтрат упарили на вакуумно-ротаційному випарюванні при температурі 60-70 °С до густого залишку. Шрот залили гарячою водою у співвідношенні 1:10 і екстрагували на водяній бані протягом 2 год. Шрот відфільтрували через вакуумний фільтр і повторили екстракцію ще 2 рази, тривалість кожного разу складала 30-40 хв. Водні екстракти об'єднали та упарили до густого залишку. Отримані густі спиртовий і водний екстракти об'єднали і висушують до сухого залишку за допомогою вакуумної сушарки.

Вихідна вага сухого екстракту склала 110 г, що відповідає 32,74 %.

Приклад 2

Дослідження специфічної активності сухого екстракту трави чорнобривців було проведено на білих безпородних щурах самицях масою тіла 220-250 г. До початку експерименту тварин рандомізували на групи залежно від маси їх тіла. Протягом 10 діб тваринам внутрішньошлунково за допомогою металевого зонда вводили сухий екстракт трави чорнобривців один раз на добу в дозі 50 мг/кг маси тварини.

При проведенні досліджень використовували аналогічний за фармацевтичною дією препарат як препарат порівняння - таблетки "Аллохол", виробництва ПАТ НВЦ "Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод", Україна у дозі 80 мг/кг та капсули "Силібор", виробництва ТОВ "Фармацевтична компанія "Здоров'я", Україна у дозі 100 мг/кг. Обидва препарати порівняння вводили тваринам внутрішньошлунково один раз на добу впродовж десяти діб, причому останнє введення здійснили за 1 годину до тестування жовчогінної дії препаратів.

Про функціональну здатність печінки свідчили за інтенсивністю вироблення нею жовчі. Після наркотизації ефіром тварин вивели з експерименту. Потім проводили розтин їх черевної порожнини, знаходили загальну жовчну протоку, у яку одним кінцем вставляли канюлю діаметром 1 мм, другий кінець якої виводили у пробірку, в яку збирали жовч. Забір жовчі здійснювали щогодини, при цьому об'ємну швидкість секреції жовчі розраховували відносно маси тіла тварини.

У всіх дослідних тварин визначали показники жовчовиділення, холато- та жовчоутворення: інтенсивність жовчовиділення, вміст жовчних кислот та холестерину в жовчі, як показників синтетичної функції органа. Для визначення вмісту жовчі та холестеролу у виділеній жовчі використовували метод, що ґрунтується на здатності охолодженого розчину заліза хлорного давати забарвленні комплекси з жовчними кислотами та холестеролом. Також визначали літогенні властивості жовчі шляхом розрахунку холато-холестеролового коефіцієнта (ХХК). Для кожної тварини окремо розраховували загальну кількість жовчі, вироблену печінкою протягом усього експерименту. Шляхом лабораторного дослідження жовчі отримали її біохімічні показники.

За результатами вивчення жовчогінної дії сухого екстракту трави чорнобривців (дослідного зразка) встановлено, що його введення сприяло помірному стимулюванню виділення жовчі у здорових тварин, але статистично значущих відмінностей за показником об'ємної швидкості секреції жовчі не було відмічено, порівнюючи з контролем, - тварини групи інтактний контроль (дані занесені у таблицю 1).

Більш важливою властивістю жовчогінного дії запропонованого засобу, ніж збільшення об'єму виділеної жовчі, вважається збільшення вмісту жовчних кислот у жовчі.

Застосування експериментальним тваринам сухого екстракту у дозі 50 мг/кг маси тварини призвело до статистично значущого збільшення у 2,2 рази вмісту жовчних кислот у жовчі порівняно з тваринами групи інтактного контролю, хоча відносний вміст холестеролу майже не змінювався. У 3,5 разу підвищився ХХК, що характеризувало літогенні властивості дослідного зразка.

Застосування препарату порівняння "Силібор" у дозі 100 мг/кг здоровим щурам не спричиняло збільшення об'ємної швидкості секреції жовчі та незначною мірою впливало на вміст жовчних кислот у жовчі, хоча призводило до статистично значущого зниження вмісту холестеролу у жовчі. Отримані результати після введення тваринам препарату порівняння

"Силібор" показали, що даний препарат має переважно гепатопротекторні властивості, але його не можна вважати істинним холеретиком.

Препарат порівняння "Аллохол", який рекомендований методичними рекомендаціями, використовувати як еталонний. У своєму складі він містить суху жовч, порошок часнику сушеного, листя кропиви та активоване вугілля. Що стосується використання цього препарату у вітчизняній клінічній практиці, слід відмітити, що він покращує секреторну функцію клітин печінки хворих, характеризується помірним холеретичним ефектом, стимулює синтез жовчних кислот, зменшує вміст холестеролу у печінці, тому, що надлишок холестеролу випадає в осад у вигляді кристалів, які дають початок утворенню жовчних каменів.

За результатами даного дослідження препарату порівняння "Аллохол" для здорових тварин не впливало значною мірою як на збільшення об'ємної швидкості секреції жовчі, так і на самий вміст у ній жовчних кислот, але статистично значуще знижувало вміст холестеролу у жовчі.

Таким чином, проведене дослідження на експериментальних тваринах показало, що сухий екстракт трави чорнобривців виявив властивості, характерні істинним холеретикам. У здорових тварин він також дещо підвищував об'ємну швидкість секреції жовчі та статистично значуще збільшував вміст жовчних кислот у жовчі та ХХК.

Таблиця 1

Дія сухого екстракту трави чорнобривців на зміну біохімічних показників функції печінки за умов введення групам тваринам протягом 10-ти діб

Експериментальна група	n	Доза, мг/кг	Об'ємна швидкість секреції жовчі, мл/100г/3 год. (р - рівень значущості відносно ІК)	Вміст жовчних кислот у жовчі (мг/%)	Вміст жовчних кислот у жовчі (мг/% /100г)	Вміст холестеролу у жовчі (мг/%)	Вміст холестеролу у жовчі (мг/%/100г)	Холато-холестероловий коефіцієнт (ХХК)
Інтактний контроль (ІК)	5	-	0,82±0,05	255±59	219±57	33±1,9	27±2,1	7,8±2,0
Сухий екстракт чорнобривців	5	50	0,99±0,10	568±65*	544±31*	28±7,6	26±6,1	27,8±9,6*
"Силібор"	5	100	0,83±0,07	395±74	331±81	11±2,2*	9±1,9*	40,4±6,9*
"Аллохол"	3	80	0,95±0,05	280±71	261±54	23±2,2*	22±1,7	12,3±2,9

Примітки:

1. * - відмінності статистично значущі відносно групи інтактного контролю (ІК) (за критерієм Мана-Уїтні, $p < 0,050$);

2. n - кількість тварин у групі.

Приклад 3

Гостре експериментальне токсичне ураження печінки у експериментальних тварин, спричинене тетрахлоретаном є достатньо адекватною моделлю холестаза. Гостре отруєння тетрахлорметаном тварин групи позитивного контролю (ПК) викликало порушення функціонального стану печінки, що характеризувалося багатьма лабораторними показниками, які занесені у таблицю 2.

Для введення тетрахлоретану була вибрана така схема, яка найкраще дозволила відтворити чітко виражену картину порушення процесів жовчоутворення та жовчовиділення. В даному експерименті не спостерігалось загибелі тварин в жодній з усіх експериментальних груп.

Ураження печінки супроводжувалось статистично значущим підвищенням масового коефіцієнту печінки (МКП) у тварин групи позитивного контролю (ПК), відносно тварин групи інтактного контролю (ІК), що було результатом зростаючого з розвитком патології набряку печінкової тканини і вказувало на значні порушення внутрішньопечінкової гемодинаміки та впливало на відхилення лабораторних показників від норми. Застосування сухого екстракту трави чорнобривців та препарату порівняння привели до нормалізації величини даних

показників до рівня показників тварин групи інтактного контролю, що у свою чергу свідчить про зменшення інфільтраційно-деструктивних процесів у печінці.

Таблиця 2

Результати дослідження активності дії сухого екстракту
трави чорнобривців на тлі тертрахлорметанового ураження печінки

Експериментальні групи тварин	Інтактний контроль (ІК)	Позитивний контроль (ПК)	Сухий екстракт чорнобривців, 50 мг/кг	Препарат "Силібор", 100 мг/кг
МКП, г/100 г	3,52±0,09	4,11±0,21*	3,66±0,05**	3,56±0,09**
Жовч				
Об'ємна швидкість секреції жовчі, мл/100 г/год.	0,79±0,03	0,54±0,12*	1,01±0,05**	1,10±0,06*/**
Вміст жовчних кислот у жовчі мг/% / мл/100 г/год.	740±25	481±78*	832±63**/* **	1095±75*/**
Вміст холестеролу у жовчі, мг/%/ мл/100 г/год.	6,7±0,3	7,7±0,9	11,5±0,9	12,8±1,5
Холато-холестероловий коефіцієнт (ХХК)	113±8	61±7*	74±6*	91±9
Сироватка крові				
Аланінамінотрансфераза, АлАт, мккат/л	0,78±0,04	1,79±0,12*	1,32±0,11*/**	1,36±0,12*/**
Лужна фосфатаза, ммоль/с*л	2,72±0,20	5,74±0,36*	4,28±0,58**	4,14±0,57**
Загальний білок, г/л	67,1±2,7	51,7±2,9*	54,4±2,5*	50,8±1,4*
Холестерол, ммоль/л	1,91±0,15	1,03±0,16*	1,21±0,16	1,35±0,22
Сечовина, ммоль/л	4,14±0,4	5,85±0,20*	5,10±0,29	5,51±0,42*
Гомогенат печінки				
Глікоген, мг/г тканини	6,69±0,35	1,84±0,33*	2,40±0,26*	3,27±0,98*
ТБК- реактантів, мкмоль/л	62,1±4,3	108,1±12,7*	63,7±5,3**	59,9±4,3**
Відновлений глутатіон (ВГ), мкмоль/л	4,12±0,24	2,91±0,26 • (p=0,0671)	3,43±0,27	3,56±,49

Примітки:

- * відмінності статистично значущі відносно тварин групи інтактного контролю на рівні значущості $p < 0,05$ (за критерієм Ньюмена-Кейлса),
- тенденція до відмінності відносно тварин групи інтактного контролю на рівні значущості $p < 0,05$ (за критерієм Ньюмена-Кейлса) $0,05 < p > 0,1$,
- ** відмінності статистично значущі відносно тварин групи позитивного контролю на рівні значущості $p < 0,05$ (за критерієм Ньюмена-Кейлса),
- *** відмінності статистично значущі відносно тварин групи препарату порівняння на рівні значущості $p < 0,05$ (за критерієм Ньюмена-Кейлса).

5 Підтвердженням руйнівних процесів у печінці у тварин групи позитивного контролю було порушення процесів жовчоутворення та жовчовиділення, що виявилось в достовірному, відносно тварин групи інтактного контролю, гальмуванні об'ємної швидкості секреції жовчі на 32 %.

10 Отримані значення об'ємної швидкості секреції жовчі у експериментальних тварин після введення їм сухого екстракту трави чорнобривців та препаратів порівняння (в якості медикаментозної корекції) на тлі відтвореної патології не тільки нормалізувались, а навіть відмічалась їх особлива динаміка і ці значення перевищували рівень об'ємної швидкості секреції жовчі у тварин групи інтактного контролю (ІК). Вміст жовчних кислот та холестеролу у жовчі перерахований на кількість жовчі, що виділялась щогодини, в групі тварин, що отримувала сухий екстракт трави чорнобривців нормалізувався до рівня тварин групи інтактного контролю. В групі тварин, що отримували препарати порівняння рівень вмісту жовчних кислот та холестеролу перевищував рівень цього вмісту у групі тварин інтактного контролю, що було обумовлене також підвищенням об'ємної швидкості секреції жовчі.

Отже, жовчогінна дія сухого екстракту трави чорнобривців на експериментальній моделі токсичного ураження печінки була достатньо вираженою і сприяла нормалізації лабораторних показників жовчі до рівня цих показників у тварин групи інтактний контроль.

Після введення експериментальним тваринам досліджуваного сухого екстракту трави чорнобривців та препаратів порівняння відмічалось зменшення виразності цитолізу, про що свідчить статистично значуще зниження рівня аланін амінотрансфераза АлАт у сироватці крові відносно тварин групи порівняльний контроль. Застосування тваринам екстракту трави чорнобривців та препаратів порівняння призводило до зменшення проявів холестазу і відмічалось зниження рівня ферменту лужної фосфатази (ЛФ) порівняно з тваринами групи позитивного контролю (ПК). Але зниження рівня обох ферментів ще не відновлювалось до рівня цих ферментів у тварин групи інтактний контроль (ІК). Що стосується зниження рівня загального білка в сироватці крові у тварин усіх експериментальних груп, то це свідчить про відновлення мембранних структур гепатоцитів за рахунок перерозподілу білка в печінці. Але застосування екстракту трави чорнобривців та препаратів порівняння не вплинули на нормалізацію рівня загального білка. Потрібно також відмітити, що застосування екстракту трави чорнобривців та препаратів порівняння призводило до незначного підвищення кількості глікогену у тканинах печінки.

Застосування екстракту трави чорнобривців та препаратів порівняння на відтворювальній нами моделі патологічної печінки супроводжувалось активацією процесів перекисного окислення ліпідів ПОЛ, про що свідчить підвищення вмісту ТБК- реактантів у тварин групи порівняльного контролю (ПК) на тлі тенденції до зменшення пулу відновленого глутатіону (ВГ).

Достовірне зниження вмісту холестерину відносно інтактного контролю на тлі збереженого пулу жовчних кислот в жовчі, характеризує активацію фізіологічного компенсаторного АОЗ організму, що відбилосся на зміні біохімічних показників в гомогенаті печінки, а саме достовірному зниженню вмісту ТБК-реактантів на тлі тенденції до збільшення пулу ВГ.

Лікування експериментальних тварин сухим екстрактом трави чорнобривців та препаратами порівняння призводило до достовірного зниження ТБК-реактантів, на тлі недостовірно підвищеного рівня ВГ, як показників стану системи ПОЛ/АОС, що свідчить про інтенсифікацію процесів ПОЛ та функціональну дієспроможність глутатіонового захисту.

У результаті проведеного вивчення впливу застосування сухого екстракту трави чорнобривців експериментальним шляхом на тлі токсичного гепатиту, викликаного тетрахлорметаном, що супроводжувався холестазом було встановлено, що цей вплив характеризується високою ефективністю. Досягнуто нормалізацію об'ємної швидкості секреції жовчі та вмісту жовчних кислот в жовчі, покращувались біохімічні показники у сироватці крові та гомогенаті печінки. Застосування тваринам сухого екстракту чорнобривців дозою, у 2 рази меншою у порівнянні з капсулами "Силібор" вказувало на відсутність значущих відмінностей у отриманих лабораторних показниках, але сприяло не лише нормалізації показників жовчовиділення до рівня таких показників у тварин групи інтактного контролю (ІК), але перевищувало їх.

Отже, запропонований спосіб забезпечує отримання біологічно активних речовин з сухої рослинної сировини - трави чорнобривців - у вигляді сухого екстракту з жовчогінною та гепатопротекторною активністю і може бути використаний у промисловому виробництві лікарських препаратів рослинного походження, призначених для лікування і профілактики захворювань печінки.

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 15745, Україна, МПК(2006) А61К 36/00, заявл. 16.01.2006, опубл. 17.07.2006, Бюл. № 7.

3. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) /за редакцією О. В. Стефанова. - К.: Авіцена, 2001. - 528с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання рослинної субстанції з жовчогінною та гепатопротекторною активністю, що включає етап екстрагування, фільтрації та упарювання подрібненої рослинної сировини, який **відрізняється** тим, що як рослинну сировину використовують суху траву чорнобривців, яку заливають 70 % спиртом етиловим до утворення "дзеркала" на поверхні, екстрагують протягом 24 год. при кімнатній температурі, фільтрують через вакуумний фільтр, отриманий фільтрат упарюють до густого залишку, а шрот заливають гарячою водою у співвідношенні 1:10 і

екстрагують на водяній бані протягом 2 год., відфільтровують, з наступним дворазовим екстрагуванням фільтрату тривалістю 30-40 хв. кожного разу, потім водні фільтрати об'єднують та упарюють до одержання густого залишку, після чого густі спиртовий і водний залишки об'єднують та висушують.

5

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

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