



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106927** (13) **U**
(51) МПК
A61K 36/704 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2015 11548</p> <p>(22) Дата подання заявки: 23.11.2015</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.05.2016</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.05.2016, Бюл.№ 9</p>	<p>(72) Винахідник(и): Лукіна Ірина Андріївна (UA), Мазулін Олександр Владиленович (UA), Бсленічев Ігор Федорович (UA), Абрамов Андрій Володимирович (UA), Мазулін Георгій Владиленович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035 (UA), Лукіна Ірина Андріївна, вул. Перемоги, 36-а, кв. 51, м. Запоріжжя, 69001 (UA), Мазулін Олександр Владиленович, пр. Леніна, 144, кв. 153, м. Запоріжжя, 69095 (UA), Бсленічев Ігор Федорович, пр. Ювілейний, 26, кв. 61, м. Запоріжжя, 69074 (UA), Абрамов Андрій Володимирович, вул. Кремлівська, 75, кв. 84, м. Запоріжжя, 69041 (UA), Мазулін Георгій Владиленович, вул. Комарова, 27, кв. 15, м. Запоріжжя, 69104 (UA)</p>
---	---

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ КОМПЛЕКСУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЮ ТА АНТИОКСИДАНТНОЮ АКТИВНІСТЮ **3**

(57) Реферат:

Спосіб отримання комплексу біологічно активних речовин з гепатопротекторною та антиоксидантною активністю шляхом подрібнення повітряно-сухої рослинної сировини, екстракції гарячою очищеною водою при підтриманні постійного температурного режиму та подальшого сушіння отриманого водного витягу. Як сировину використовують траву гірчаку печечуйного (*Polygonum persicaria* L.). Перед екстрагуванням рослину сировину залишають на 30 хвилин для повного набухання. Екстракцію проводять п'ятикратним об'ємом води очищеної (1:5) при температурі 40 °С протягом 40 хвилин. Водний витяг фільтрують, заморожують при t=-50 °С у камері з повітряною системою охолодження протягом 60 хвилин. Процес ліофілізації статично замороженого екстракту здійснюють у субліматорі до отримання сухого екстракту.

UA 106927 U

Корисна модель належить до галузі фармації та медицини, а саме гастроентерології, і стосується лікарських засобів рослинного походження. Засіб може бути використаний як субстанція при створенні відповідних фітопрепаратів у різних лікарських формах для лікування і профілактики захворювань печінки.

5 На наш час актуальним є створення гепатопротекторних препаратів. Ріст захворювань печінки представляє одну з важливих медичних проблем. Це пов'язано з тим, що постійно погіршується екологічне середовище, збільшується надходження хімічних речовин до організму людини. Крім цього, зростає вживання лікарських засобів синтетичного походження та алкоголю. Для лікування захворювань печінки в світовій практиці застосовують як синтетичні, так й фітотерапевтичні лікарські засоби. Попит на гепатопротекторні засоби рослинного походження обґрунтовується тим, що інші препарати в більшості випадків спричинюють побічну дію. Цінними компонентами рослинної сировини антиоксидантної та гепатопротекторної дії є флавоноїди. Флавоноїди здатні при більшості захворювань не тільки захистити ліполіз гепатоцитів від оксидативного стресу, але й нормалізувати метаболічні процеси в печінці.

15 Найближчим аналогом до корисної моделі є спосіб одержання комплексу БАР з гепатопротекторною, регенеруючою та гематостатичною дією [Пат. 58666, Україна, МПК А61К 36/28 U201009790, заявл. 06.08.2010, опубл. 26.04.2011], який передбачає трикратну екстракцію подрібненої рослинної сировини, а саме трави нуту звичайного, водою очищеною при загальному співвідношенні сировини до екстрагенту 1:23 при постійному підтриманні температурного режиму 80 °С з подальшим об'єднанням відфільтрованих екстрактів, їх упарюванням, очищенням спиртом етиловим 96 % та сушінням. Першу екстракцію проводять при співвідношенні: екстрагент 1:10 протягом 2,0 годин, другу та третю - при співвідношенні: екстрагент 1:8 та 1:5 відповідно по 0,5 годин кожна.

20 Даний спосіб вибрано прототипом. Прототип і корисна модель, що заявляється, мають наступні спільні ознаки: подрібнення повітряно-сухої рослинної сировини, екстракція гарячою водою очищеною при підтриманні постійного температурного режиму та подальше сушіння отриманого водного витягу.

25 Але, відомий спосіб дуже трудомісткий - громіздка екстракція, займає приблизно 4 години. Окрім того, отриманий екстракт осаджують спиртом етиловим 96 %, що може спричинити випадання в осад цінних БАР. Недостатньо високий вихід екстрактивних речовин у перерахунок на суху вихідну сировину. Екстрагування при постійному підтриманні температурного режиму 80 °С спричинює руйнування термолабільних БАР.

30 В основу корисної моделі поставлена задача розробити удосконалення способу отримання комплексу БАР з гепатопротекторною та антиоксидантною активністю шляхом зменшення кількості етапів екстракції і її температурного режиму та подальших умов сушіння, для отримання біологічно активного екстракту з високою фармакологічною активністю.

35 Поставлена задача вирішується тим, що спосіб полягає в подрібненні повітряно-сухої рослинної сировини, екстракції гарячою очищеною водою при підтриманні постійного температурного режиму та подальшому сушінні отриманого водного витягу, згідно з корисною моделлю, як сировину використовують траву гірчаку почечуйного (*Polygonum persicaria* L.), перед екстрагуванням рослинну сировину залишають на 30 хвилин для повного набухання, екстракцію проводять п'ятикратним об'ємом води очищеної (1:5) при температурі 40 °С протягом 40 хвилин, далі водний витяг фільтрують, заморожують при $t = -50$ °С у камері з повітряною системою охолодження протягом 60 хвилин, процес ліофілізації статично замороженого екстракту здійснюють у субліматорі до отримання сухого екстракту.

45 Корисна модель дає можливість в стислий термін отримати ліофілізований екстракт з трави гірчаку почечуйного, який проявляє гепатопротекторну та антиоксидантну активність, завдяки великій концентрації термолабільних БАР. Розвиток фармацевтичної промисловості призвів до необхідності розробки препаратів, які можуть при різних зовнішніх умовах зберігати свої лікувальні властивості. Сублімаційне сушіння є щадним методом отримання екстрактів з рослинної сировини. Суть методу полягає в зневодненні водного витягу шляхом заморожування з подальшим висушуванням вакуумним способом. Цей метод дає можливість максимально зберегти термолабільні БАР (флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, амінокислоти, вітаміни, леткі сполуки, ферменти та ін.). Ліофілізовані препарати можуть зберігатися тривалий час, вони мало чутливі до коливань температури в процесі зберігання, легко переводяться в нативний стан після введення розчинника (вода очищена, фізіологічний розчин). Субстанції, отримані за корисною моделлю, зберігають біологічну активність та цілісну структуру. Ліофілізований екстракт з трави гірчаку почечуйного має задану дисперсність, не грудкується у процесі довготривалого зберігання (до 3 років в умовах нерегульованого температурного режиму). Зберігає первинний колір та форму. Не менш важливим критерієм ліофілізованого екстракту є

підвищене засвоєння його, а також можливість досягти найбільш точне дозування. Екстракт отриманий, заявленим способом, відповідає вимогам стандартів країн ЄС.

5 Досліджено офіцінальну лікарську рослину сировину гірчаку печечуйного (*Polygonum persicaria* L.) та встановлений економічно доцільний спосіб одержання з неї ліофілізованого екстракту з вираженою гепатопротекторною та антиоксидантною активністю.

Всі ознаки корисної моделі були визначені дослідним шляхом з урахуванням біологічної активності одержаних комплексів, ефективності, доступності та нешкідливості реактивів, практичного відтворення способу у промислових умовах.

10 Корисну модель виконують наступним чином.
Приклад 1.

Точну наважку подрібненої до діаметр часточок 0,3 мм повітряно-суху рослину сировину (верхівки пагонів довжиною 10-15 см з прилеглим суцвіттям та листям) гірчаку печечуйного екстрагували водою очищеною в асептичних умовах у співвідношенні сировини до екстрагенту 1:5, залишали на 30 хвилин для повного набухання сировини. Екстрагування проводили при постійному підтриманні температурного режиму +40 °С протягом 40 хвилин.

15 Отриманий витяг вміщували в епіндорфи об'ємом 1,5 мл, вносили до камери для заморожування (t=-50 °С) з повітряною системою охолодження. Технологічний процес статичного заморожування здійснювали при вертикальному положенні епіндорфів. Тривалість процесу складала 1 год.

20 Процес ліофілізації екстрактів проводили на установці Christ Alpha 1-2 LD plus. Перед початком процесу сублімації, субліматор та касети обробляли спиртом етиловим (96 %). До субліматору вносили відкриті епіндорфи в гнізда касети, герметично закривали та вмикали вакуумний пристрій. У процесі сушіння при зниженні тиску в субліматорі на 4 Па спостерігали зниження температури витяжок до -50 °С. Загальний термін сублімації складав 6 годин. Вихід ліофілізованого екстракту з 1 л витягу не менше ніж 30 г.

25 Приклад 2.

Для вивчення гепатопротекторної активності ліофілізованого екстракту з трави гірчаку печечуйного, одержаного за заявленим способом, вивчали його активність в умовах хронічної алкоголізації.

30 Експериментальні дослідження проводились на нелінійних білих щурах-самцях, отриманих з розплідника Інституту фармакології і токсикології АМН України. Вік тварин складав 3,5 місяці, маса тіла - 165-170г. До проведення експерименту щодня протягом 14 днів всі тварини зважувалися і оглядалися. Огляд включав в себе оцінку загального стану та поведінки.

Таблиця 1

Біохімічні показники крові тварин при хронічній алкогольній інтоксикації (ХАІ) на 31-й день експерименту та при лікуванні ліофілізованим екстрактом(ЛЕ) з трави гірчаку печечуйного

Показники	Інтактна група (n=10)	Контроль (ХАІ) (n=10)	ХАІ + ЛЕ з трави гірчаку печечуйного (n=10)
Загальний білірубін, мкмоль/л	2,7±0,21	7,2±0,47	6,5±0,31
АлТ, од/л	0,19±0,01	1,89±0,18	0,97±0,07*
АсТ, од/л	0,53±0,04	1,57±0,43	0,87±0,07*
ЛФ, од/л	0,63±0,04	2,73±0,11	2,55±0,07
КФ, мкмоль/л	0,71±0,03	2,33±0,21	1,92±0,11
Гексаналовий сон, хв	26±1,8	48,1±4,15	31,7±3,1*
Тимолова проба, од. помутніння	1,42±0,11	9,12±0,51	5,00±0,42*

* - тут і далі статистично достовірна відмінність від групи контрольних тварин (p<0,05).

35

Гепатопротекторну активність зразків, визначали за вмістом білірубіну, активності трансаміназ (АлТ, АсТ), фосфотаз (лужна (ЛФ) і кисла (КФ)), сироватки крові, яка навантажувалась пробами (гексеналовий тест, тимолова проба) в крові експериментальних тварин. За активності супероксиддисмутази (СОД), накопиченню продуктів окислювальної модифікації білка - альдегідфенілгідрозонів (АФГ) і карбоксифенілгідрозонів (КФГ) у печінці оцінювали стан антиоксидантної, детоксикаційної системи печінки і процесів оксидативного стресу. Отримані дані наведені в табл. 1.

40

У групі тварин з токсичним гепатитом достовірно підвищився рівень білірубіну у порівнянні з групою здорових тварин. У цій групі спостерігалось і підвищення активності лужної і кислої фосфатази в сироватці крові на тлі підвищення тимолової проби. Показники оксидативного стресу тварин при хронічній алкогольній інтоксикації (ХАІ) на 31-й день експерименту наведені у табл. 2.

Таблица 2

Показники оксидативного стресу тварин при хронічній алкогольній інтоксикації (ХАІ) на 31-й день експерименту

Показники	Інтактна група (n-10)	Контроль (ХАІ) (n-10)	ХАІ + ЛЕ з трави гірчаку печечуйного (n-10)
СОД, у.о./мг/хв	268±21,1	110,7±8,2	161,4±8,1*
АФГ, у.о./г/білка	6,23±0,51	21,2±1,1	14,2±0,88*
КФГ, у.о./г/білка	2,88±0,21	12,5±0,89	7,8±0,67*

* - тут і далі статистично достовірна відмінність від групи контрольних тварин (p<0,05)

Дані наведені в табл. 1 та табл. 2 свідчать, що курсове введення тваринам з токсичним гепатитом ліофілізованого екстракту з трави гірчаку печечуйного виявляло гепатопротективну дію. Встановлено зниження біохімічних маркерів ураження печінки крові тварин в умовах хронічної алкоголізації. Також було зареєстровано достовірне зниження активності трансаміназ (АлТ і АсТ) у крові алкоголізованих тварин в порівнянні з групою контролю. Відзначалося достовірне зниження тимолової проби в цих групах тварин у порівнянні з групою контролю. Ліофілізований екстракт з трави гірчаку печечуйного надавав і певну дію на холестазу - помірне зниження рівня білірубіну та активності лужної фосфатази в крові експериментальних тварин. Також спостерігалось і зниження активності кислої фосфатази в крові тварин.

Призначення ліофілізованого екстракту з трави гірчаку печечуйного сприяло відновленню детоксикаційної функції печінки, про що свідчить достовірне зниження тривалості гексаналового сну. Проба "Гексеналовий сон" показує, що після введення ліофілізованого екстракту з трави гірчаку печечуйного курсом, відбувається відновлення активності ферментів печінки і свідчить про відновлення її детоксикаційної функції печінки.

Приклад 3.

Антиоксидантну активність ліофілізованого екстракту з трави гірчаку печечуйного, що містить комплекс біологічно активних сполук (у тому числі термолабільних), одержаного за заявленим способом, вивчали в умовах токсичного гепатиту.

Для оцінки антиоксидантної активності використовували метод по інгібуванню окисної модифікації білка, викликаній реактивом Фентона. Отримані результати наведені у табл. 3.

Таблица 3

Антиоксидантна активність ліофілізованого екстракту з трави гірчакупечечуйного (10⁻⁷г) in vitro (n=5) за інгібуванням окисної модифікації білка

Серія	АФГ, у.о./г	КФГ, у.о./г
Інтактні тварини	1,07±0,002	1,37±0,02
Контроль	9,95±007	6,87±0,002
ЛЕ з трави гірчаку печечуйного	7,21±0,01*	4,72±0,02*
Емоксипіну (10 ⁻⁵ М)	7,0±0,002*	4,87±0,01*

Отримані дані показали, що досліджуваний ліофілізований екстракт проявляє антиоксидантну активність і за ступенем зниження АФГ і КФГ конкурує з активністю емоксипіну.

Отже, корисна модель в формі ліофілізованого екстракту з трави гірчаку печечуйного, є простою у відтворенні, економічною та екологічно безпечною, та може бути застосована в умовах промислового виробництва з використанням стандартного обладнання.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання комплексу біологічно активних речовин з гепатопротекторною та антиоксидантною активністю шляхом подрібнення повітряно-сухої рослинної сировини, екстракції гарячою очищеною водою при підтриманні постійного температурного режиму та подальшого сушіння отриманого водного витягу, який **відрізняється** тим, що як сировину використовують траву гірчаку печечуйного (*Polygonum persicaria* L.), перед екстрагуванням рослинну сировину залишають на 30 хвилин для повного набухання, екстракцію проводять п'ятикратним об'ємом води очищеної (1:5) при температурі 40 °С протягом 40 хвилин, далі водний витяг фільтрують, заморожують при $t=-50$ °С у камері з повітряною системою охолодження протягом 60 хвилин, процес ліофілізації статично замороженого екстракту здійснюють у сублиматорі до отримання сухого екстракту.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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