



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 147169

(13) U

(51) МПК

A61K 36/704 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	а 2018 01601	(72) Винахідник(и):	Лукіна Ірина Андріївна (UA), Мазулін Олександр Владиленович (UA), Бєленічев Ігор Федорович (UA), Абрамов Андрій Володимирович (UA)
(22) Дата подання заявки:	19.02.2018	(73) Володілець (володільці):	ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035 (UA), Лукіна Ірина Андріївна, пр. П. Тичини, 10, кв. 52, м. Київ, 02098 (UA), Мазулін Олександр Владиленович, пр. Леніна, 144, кв. 153, м. Запоріжжя, 69095 (UA), Бєленічев Ігор Федорович, пр. Ювілейний, 26, кв. 61, м. Запоріжжя, 69074 (UA), Абрамов Андрій Володимирович, вул. Кремлівська, 75, кв. 84, м. Запоріжжя, 69041 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	22.04.2021		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.05.2018, Бюл.№ 10		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	21.04.2021, Бюл.№ 16		

## (54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ЛІОФІЛІЗОВАНОГО ЕКСТРАКТУ ТРАВИ ГІРЧАКА ПЕРЦЕВОГО

### (57) Реферат:

Спосіб отримання ліофілізованого екстракту з гепатопротекторною, антиоксидантною, гемостатичною, гастропротекторною активністю, який полягає в подрібненні повітряно-сухої рослинної сировини, набуханні екстракції водою очищеною при підтриманні постійного температурного режиму, фільтрації та подальшому сублімаційному сушінні отриманого екстракту, причому як сировину використовують траву гірчака перцевого (*Polygonum hydropiper* L.), перед екстрагуванням рослинну сировину обробляють ультразвуком для повного набухання у п'ятикратному об'ємі води очищеної (1:5) та проводять екстрагування при температурі 40 °С протягом 40 хв., далі отриманий водний витяг фільтрують, піддають сублімації до отримання ліофілізованого екстракту.

UA 147169 U

UA 147169 U

Корисна модель належить до фармації та медицини і стосується способу отримання ліофілізованого екстракту з трави гірчака перцевого та створення на його основі гепатопротекторного, антиоксидантного, гемостатичного, гастропротекторного засобу. Спосіб може бути використаний при створенні відповідних фітопрепаратів у лікарських формах для лікування і профілактики захворювань печінки, виразок тощо.

Відомий спосіб отримання лікарського засобу з трави гірчака перцевого "Водяного перцю екстракт рідкий" [Реєстраційне посвідчення: UA/1093/01/01; термін дії посвідчення: з 21.07.2014 по 21.07.2019; виробник: ПАТ "Фітофарм", м. Артемівськ, Донецька обл., Україна]. Цей засіб використовується як допоміжний засіб в акушерсько-гінекологічній практиці при маткових післяпологових кровотечах, при субінволюції матки, гіперменорагії, при кровотечах із дрібних судин шлунка, кишечнику, при несильних гемороїдальних кровотечах. Передбачає екстрагування сировини 70 % етанолом.

Недоліком вказаного способу є одержання засобу з вузькоспрямованою фармакологічною дією, він не дає можливості одержати стабільну, стандартизовану субстанцію для створення лікарського засобу, не забезпечує максимального вилучення біологічно активних речовин та збереженню термолабільних сполук з рослинної сировини, на екстрагування витрачається велика кількість 70 % етанолу. Пропонована лікарська форма не є зручною для застосування пацієнтами.

Отримання ліофілізованих екстрактів з різної рослинної сировини, яка має виражену фармакологічну активність, набирає обертів. Спосіб отримання ліофілізованого фітоекстракту листя шавлії лікарської [Пат. 48744, Україна, МПК А61К 39/00 U20912169, заявл. 26.11.2009, опубл. 26.04.2011], що включає екстрагування подрібненої (розмір частинок 1-3 мм) сировини водою очищеною при температурі 90-95 °С у співвідношенні (сировина-екстрагент) 1:15-1:20 упродовж 30-45 хвилин 3-4 рази, об'єднані витяжки відстоюють при 8-10 °С протягом 8-10 годин, фільтрують і проводять ліофільне висушування за допомогою сублімаційного апарату.

Даний спосіб і корисна модель, що заявляється, мають наступні спільні ознаки: подрібнення повітряно-сухої рослинної сировини, екстракція водою очищеною, підтримка відповідного температурного режиму та подальше ліофілізації отриманого екстракту за допомогою сублімаційного апарату.

Недоліком способу є громіздка екстракція, використання високого температурного режиму, який не зберігає термолабільні речовини.

Найближчим аналогом за технічною суттю та результатом, що досягається, є спосіб отримання комплексу біологічно активних речовин з гепатопротекторною та антиоксидантною активністю [Пат. 106927, Україна, МПК А61К 36/704 U201511548, заявл. 23.11.2015, опубл. 10.05.2016], який передбачає екстракцію сировини гарячою очищеною водою при підтриманні постійного температурного режиму та подальшого сушіння отриманого водного витягу. Як сировину використовують траву гірчака 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. Водний витяг фільтрують та ліофілізують у субліматорі до отримання сухого екстракту.

Даний спосіб обрано як найближчий аналог. Найближчий аналог і корисна модель, що заявляється, мають наступні спільні ознаки: подрібнення повітряно-сухої рослинної сировини, екстракція очищеною водою при підтриманні постійного температурного режиму, фільтрації та подальшому сублімаційному сушінні отриманого екстракту.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу отримання ліофілізованого екстракту з гепатопротекторною, антиоксидантною, гемостатичною, гастропротекторною активністю, шляхом використання в якості рослинної сировини трави гірчака перцевого і проведення процесу при оптимізованих параметрах, що забезпечать отримання ефективного засобу у формі рослинного екстракту з вираженою фармакологічною активністю, обумовленою комплексом біологічно активних речовин, вилучених саме таким способом. Заявлений спосіб є простим і економічно доцільним при промисловому здійсненні.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який полягає в подрібненні повітряно-сухої рослинної сировини, екстракції очищеною водою при підтриманні постійного температурного режиму, фільтрації та подальшому сублімаційному сушінні отриманого екстракту новим є те, що як сировину використовують траву гірчака перцевого (*Polygonum hydropiper* L.), перед екстрагуванням рослинну сировину обробляють ультразвуком з частотою 22 кГц для повного набухання, екстракцію проводять п'ятикратним об'ємом води очищеною (1:5) при температурі 40 °С протягом 40 хв., далі отриманий водний витяг фільтрують, піддають сублімації до отримання ліофілізованого екстракту.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає в такому.

Заявлений спосіб дає можливість в стислий термін отримати ліофілізований екстракт з трави гірчака перцевого, який проявляє гепатопротекторну, антиоксидантну, гемостатичну, гастропротекторну активність, завдяки великій концентрації термолабільних БАР.

Розвиток фармацевтичної промисловості призвів до необхідності розробки препаратів, які можуть при різних зовнішніх умовах зберігати свої лікувальні властивості. Тому отримання ліофілізованих екстрактів з рослинної сировини є дуже перспективним направлення в сучасному світі. Ліофілізація (сублімація) - це процес консервації БАР, який поєднує в собі два методи, метод заморожки і метод дегідратації. Перший крок для реалізації цього процесу - це заморожування всієї вільної води в рослинній сировині (водна витяжка), і наступний - дегідратація (зневоднення) в вакуумі, тобто вся ця вода, після заморожки знаходиться в твердому стані, переходить відразу ж в стан пара, не повертаючись у рідкий стан, ніж гарантує грамотну сублімацію. У разі такої обробки зберігаються максимально кількість БАР, в тому числі термолабільні (протеїни, вітаміни тощо). Рослинна сировина зберігає свою початкову форму, колір і текстуру, і її насичення вологою буде швидким і повноцінним. Існує багато переваг при зберіганні таких екстрактів. 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 цим способом, зберігають біологічну активність та цілісну структуру. Ліофілізований екстракт з трави гірчака перцевого 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 існуючим вимогам стандартів країн ЄС.

Але для отримання ліофілізованого екстракту, треба підібрати певні умови щоб вилучити максимальну кількість БАР з рослинної сировини. Перед екстрагуванням рослинну сировину треба її замочувати, однак це збільшує час отримання кінцевого продукту. Одним з перспективних фізичних методів впливу на речовини з метою інтенсифікації технологічного процесу є метод, заснований на використанні механічних коливань ультразвукового діапазону. Практика свідчить, що використання ультразвуку зменшує час екстрагування до 10 годин, збільшую кількість БАР, збільшує ефективність процесу екстрагування. Тому нами були підібрані технологічні параметри з використанням ультразвуку, який в умовах фармацевтичного виробництва легко відтворюється.

Уніфіковані технологічні умови отримання ліофілізованого екстракту з трави гірчака перцевого дало змогу збільшити вихід БАР завдяки чому нам вдалось розширити фармакологічну активність.

Авторами всебічно досліджено рослинну сировину траву гірчака перцевого та встановлений економічно доцільний спосіб одержання з неї ліофілізованого екстракту з вираженою гепатопротекторною, антиоксидантною, гемостатичною, гастропротекторною активністю.

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

Спосіб здійснюється таким чином.

Приклад 1.

Точну наважку подрібненої повітряно-сухої рослинної сировини трави гірчака перцевого екстрагуємо водою очищеною в асептичних умовах у співвідношенні сировини до екстрагенту 1:5, перед екстрагуванням рослинну сировину обробили ультразвуком (УЗДН - А1200Т) з частотою 22 кГц для повного набухання. Екстрагування проводили при постійному підтриманні температурного режиму +40 °С протягом 40 хв.

Отриманий витяг вносили в пробірки "епіндорфи" об'ємом 1,5 мл, ставили до камери для заморожування ( $t = -50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) з повітряною системою охолодження. Технологічний процес статичного заморожування здійснювали при вертикальному положенні "епіндорфів" протягом 1 год. Процес ліофілізації проводили на установці ChristAlpha 1-2 LDplus (Німеччина). Перед початком процесу сублімації субліматор та касети обробляли спиртом етиловим (96 %). До субліматору вносили відкриті "епіндорфи" в гнізда касети, відкривали та вмикали вакуумний пристрій. У процесі сушіння при зниженні тиску в субліматорі на 4 Па спостерігали зниження температури витяжок до  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Загальний термін сублімації складав 6 год. Вихід ліофілізованого екстракту з 1 л витягу складав не менше ніж 30 г.

Приклад 2.

З метою вивчення гепатопротекторної активності ліофілізованого екстракту (ЛЕ) з трави гірчака перцевого, одержаного за заявленим способом, вивчали його активність в умовах хронічної алкоголізації (ХАІ).

Експериментальні дослідження проводились на білих нелінійних щурах обох статей масою тіла 165-170 г (віком 3,5 міс.), одержаних з розплідника ДУ "Інституту фармакології та токсикології НАМН України". До проведення експерименту щодня протягом 14 днів всі тварини зважувалися і оглядалися. Огляд включав в себе оцінку загального стану та поведінки.

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

Таблиця 1

Біохімічні показники в сироватці крові щурів  
за умов ХАІ на 31-й день експерименту,  $M \pm m$  (n=10)

Група тварин	Інтактний контроль	Контроль (ХАІ)	ХАІ + ЛЕП	ХАІ + ЛЕ з трави гірчаку почечуйного (найближчий аналог)	ХАІ + Гепабене
Показник, який досліджується					
Загальний білірубін, мкмоль/л	2,7±0,21	7,2±0,47	6,7±0,37	6,5±0,31	5,1±0,41
Ал АТ, ммоль/л*год.	0,19±0,01	1,89±0,18	0,98±0,05*	0,97±0,07*	1,11±0,08*
АсАТ, ммоль/л*год.	0,53±0,04	1,57±0,43	0,85±0,07*	0,87±0,07*	0,98±0,08*
ЛФ, мкмоль/л*с	0,63±0,04	2,73±0,П	2,61±0,05	2,55±0,07	2,71±0,07
КФ, мкмоль/л*с	0,71±0,03	2,33±0,21	1,84±0,14	1,92±0,П	1,97±0,12
Гексаналовий сон, хв.	26±1,8	48,1±4,15	30,5±2,7*	31,7±3,1*	34,5±4,2*
Тимолова проба, од. помутніння	1,42±0,11	9,12±0,51	4,87±0,22*	5,00±0,42*	6,77±0,54*

Примітка. \*р < 0,05 відносно контрольної групи

У групі тварин з токсичним гепатитом достовірно підвищився рівень білірубину 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.

Таблиця 2

Показники оксидативного стресу печінки на 31-й день експерименту за умов експериментальної ХАІ та впливу ЛЕГ, (n=10)

Група тварин	Інтактний контроль	Контроль (ХАІ)	ХАІ + ЛЕП	ХАІ + ЛЕ з трави Гірчаку почечуйного (найближчий аналог)	ХАІ + Гепабене
Показник який досліджується					
СОД, у.о./мг білка*хв.	268±21,1	110,7±8,2	167,2±7,6*	161,4±8,1*	115,2±10,2
АФГ, у.о./г білка	6,23±0,51	21,2±1,1	13,7±0,67*	14,2±0,88*	17,2±1,1*
КФГ, у.о./г білка	2,88±0,21	12,5±0,89	8,1±0,51*	7,8±0,67*	11,8±1,0

Примітка. \*р< 0,05 відносно контрольної групи

Дані наведені в табл. 1 та табл. 2 свідчать, що курсове введення тваринам з токсичним гепатитом ліофілізованого екстракту з трави гірчака перцевого 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 гірчака перцевого надавав і певну дію на холестазу - помірне зниження рівня білірубину та активності лужної фосфатази в крові експериментальних тварин. Також спостерігалось і зниження активності кислої фосфатази в крові тварин. Застосування ліофілізованого екстракту з трави гірчаку перцевого 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 перцевого курсом, відбувається відновлення активності ферментів печінки і свідчить про відновлення її детоксикаційної функції печінки.

#### Приклад 3.

Антиоксидантну активність ліофілізованого екстракту з трави гірчака перцевого, що містить комплекс біологічно активних сполук (у тому числі термолабільних), одержаного за заявленим способом, вивчали в умовах *in vitro*.

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

Таблиця 3

Антиоксидантна активність ЛЕП ( $10^{-7}$ г) за інгібуванням окисної модифікації білка *in vitro*, (n=5)

Показник, який досліджується Група тварин	АФГ, у.о./г білка	КФГ, у.о./г білка
Інтактний контроль	1,07±0,002	1,37±0,02
Контроль	9,95±007	6,87±0,002
ЛЕП	7,30±0,02*	4,73±0,02*
ЛЕ з трави гірчаку почечуйного (найближчий аналог)	7,21±0,01*	4,72±0,02*
Емоксипіну ( $10^{-5}$ М)	7,0±0,002*	4,87±0,01*

Примітка. \*p < 0,05 відносно контрольної групи

Дослідження АОА по гальмуванню ОМБ, викликаній реактивом Фентона, показали, що досліджувані екстракти чинять бажану активність і за ступенем зниження АФГ, КФГ конкурують з активністю емоксипіну. Таким чином, проведені дослідження показали, що ЛЕП у дозі 100 мг/кг чинять антиоксидантну активність.

Таким чином, запропонована корисна модель забезпечує кращі результати у порівнянні щодо найближчого аналогу (табл. 1-3).

#### Приклад 4.

Дослідження системи згортання крові тварин за умов ХАІ проводилась за такими показниками, як час згортання крові, протромбіновий час і концентрація фібрину в крові, показали, що введення дихлоретану призводить до порушення згортання крові - гіпокоагуляція. Так, в групі контролю спостерігалось збільшення ЧЗК, збільшення ПЧ і зниження вмісту фібрину в крові. Курсове призначення тваринам з хронічною алкоголізацією ЛЕ з трави гірчака перцевого призводило до зменшення проявів гіпокоагуляції, про що свідчило достовірне зменшення часу згортання крові і ПЧ, а також збільшення вмісту фібрину в крові (табл. 4).

Таблиця 4

Вплив ЛЕП на показники згортання крові при ХАІ,  $M \pm m$  (n=10)

Показник, який досліджується Група тварин	ПТІ	ЧЗК	Фібрин, мг/мл
Інтактна контроль	14,2±1,7	147,2±27	17,2±1,8
Контрольна (ХАІ)	31,7±2,7	301±33	7,2±0,61
ХАІ+ЛЕП	19,0±1,8	200±18*	12,1±1,00

Примітка. \*p < 0,05 відносно контрольної групи

На 31 добу дослідження проводили вивчення гастропротекторної дії ЛЕП. З цією метою у щурів вилучали шлунки та промивали фізіологічним розчином для видалення вмісту. Оцінку гастропротекторної дії проводили по зниженню балів шкали пошкодження слизової шлунка: 0 відсутність пошкоджень; 0,5 гіперемія: 1 - одиничні, незначні пошкодження (1-2 точкових крововиливів); 2 множинні пошкодження (ерозії, точкові крововиливи); 3 - значні та множинні пошкодження (ерозії, крововиливи); 4 - грубі пошкодження, що охоплюють всю поверхню слизової шлунка (масові крововиливи, ерозії, перфорації).

В ході проведення досліджень було встановлено, що досліджуваний рослинний екстракт проявив гастропротекторну активність на моделі хронічної алкогольної інтоксикації (табл. 5).

Таблиця 5

Гастропротекторна активність ЛЕП на моделі ХАІ,  $M \pm m$  (n=10)

Група тварин	Середній бал за шкалою пошкодження слизової шлунку на 31 добу
Інтактна контроль	0,0±0,0
Контрольна (ХАІ)	1,8±0,1
ХАІ+ЛЕП	0,4±0,03*

Примітка. \*p < 0,05 відносно контрольної групи

Дані, представлені в табл. 5, свідчать про те, що профілактичне введення ЛЕП тваринам з ХАІ призводило до вірогідного зменшення ступеня пошкодження слизової шлунка. Якщо у більшості тварин, які отримували тривало алкоголь спостерігались гіперемії, ерозії, а у 2 тварин по 1 точковому крововиливу, то у тварин, які отримували профілактично ЛЕП слизова шлунка практично не відрізнялася від групи інтактної (у 2 тварин з кожній дослідній групі була виявлена незначна гіперемія). Таким чином, ліофілізований екстракт з трави гірчака перцевого володіє гастропротективною активністю.

Отже, заявлено новий спосіб отримання ліофілізованого екстракту з гепатопротекторною, антиоксидантною, гемостатичною, гастропротекторною активністю може бути здійснений в умовах стандартного фармацевтичного підприємства, з використанням стандартного обладнання, простий у відтворенні, економічний та екологічно безпечним. Спосіб забезпечує підвищення кількості й концентрації БАР у рослинній сировині за рахунок чого збільшується та розширюється фармакологічна активність.

Заявлений спосіб дає змогу раціонально використовувати вітчизняні сировинні ресурси.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання ліофілізованого екстракту з гепатопротекторною, антиоксидантною, гемостатичною, гастропротекторною активністю, який полягає в подрібненні повітряно-сухої рослинної сировини, набуханні екстракції водою очищеною при підтриманні постійного температурного режиму, фільтрації та подальшому сублімаційному сушінні отриманого екстракту, який **відрізняється** тим, що як сировину використовують траву гірчака перцевого (*Polygonum hydropiper* L.), перед екстрагуванням рослинну сировину обробляють ультразвуком для повного набухання у п'ятикратному об'ємі води очищеної (1:5) та проводять екстрагування

при температурі 40 °С протягом 40 хв., далі отриманий водний витяг фільтрують, піддають сублімації до отримання ліофілізованого екстракту.