



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 100292

(13) U

(51) МПК

A61K 36/74 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

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

(21) Номер заявки: u 2014 12603	(72) Винахідник(и): Юрченко Наталія Сергіївна (UA), Ільїна Тетяна Василівна (UA), Кашпур Наталія Валерівна (UA), Горяча Ольга Володимирівна (UA), Ковальова Алла Михайлівна (UA), Кошовий Олег Миколайович (UA), Очкур Олександр Васильович (UA), Кірсєв Ігор Володимирович (UA)
(22) Дата подання заявки: 24.11.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.07.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.07.2015, Бюл.№ 14	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)

(54) СПОСІБ КОМПЛЕКСНОЇ ПЕРЕРОБКИ ТРАВИ МАРЕНКИ ВОСЬМИЛИСТКОВОЇ ДЛЯ ОТРИМАННЯ ЗАСОБУ З ІМУНОМОДУЛЮЮЧОЮ ДІЄЮ**(57) Реферат:**

Спосіб комплексної переробки рослинної сировини для отримання засобу з імуномодулюючою дією шляхом попередньої багаторазової послідовної обробки рослинної сировини органічними розчинниками. Як сировину використовують траву маренки восьмилисткової (*Asperula octonaria* Klokov). Як органічні розчинники використовують хлороформ, етилацетат: спирт (8:2), екстракцію хлороформом здійснюють при загальному співвідношенні сировина : екстрагент 1:8-1:10, етилацетатно-спиртовою сумішшю (8:2) при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:10-1:13. Потім висушений шрот піддають екстракції водою - при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:4-1:5, тричі по 30 хвилин. Потім здійснюють видалення білково-полісахаридного комплексу шляхом висаджування за допомогою етилового спирту при загальному співвідношенні водний витяг : 96 % етанол 1:3 та упарювання отриманого фільтрату до видалення екстрагенту.

UA 100292 U

Корисна модель належить до хіміко-фармацевтичної галузі, а саме до способів одержання з рослинної сировини біологічно активних комплексів з імуномодулюючою активністю.

Останнім часом спостерігається зниження показників здоров'я і ріст захворюваності населення внаслідок ряду об'єктивних причин, серед яких важливе місце займає погіршення екологічної ситуації, велике інформаційне та нервово-емоційне навантаження, зниження соціальної захищеності населення та багато інших факторів. Люди зі зниженою активністю імунної системи входять в групу ризику за станом здоров'я, відмічається зниження природної резистентності та імунологічної реактивності організму, яке пов'язане з ослабленням імунних, детоксикаційних та інших адаптаційних механізмів.

Порушення функцій імунної системи відіграють важливу роль в хронізації захворювань, розвитку ускладнень. У зв'язку з поширенням імунодефіцитних станів проблема захворювань, зумовлених порушенням в системі імунітету, переросла в медико-соціальну проблему.

Численними дослідженнями підтверджено, що відновлення функціональної активності імунної системи є неодмінною умовою успіху комплексної терапії різних захворювань [1, 4].

Для корекції імунодефіцитних станів використовуються лікарські засоби як синтетичного, так і рослинного походження, які, на відміну від синтетичних, мають ряд переваг: м'яку імуномодулюючу дію, низьку токсичність, активацію функцій не тільки імунної, нервової та ендокринної систем завдяки наявності комплексу біологічно активних речовин (БАР), який діє на організм в цілому.

На фармацевтичному ринку України імуномодуляторів рослинного походження нараховується незначна кількість. Тому актуальним для медицини та фармації є пошук та розробка вітчизняних ефективних лікарських засобів рослинного походження з імуномодулюючою дією.

При одержанні лікарських засобів рослинного походження важливе місце займає питання комплексної переробки сировини.

Відомий аналог є спосіб комплексної переробки плодів горобини звичайної шляхом послідовної екстракції повітряно-сухої подрібненої сировини розчинниками з різною діелектричною сталою, зокрема водою та гідрофільними і гідрофобними органічними розчинниками, причому на кожному етапі екстракції, починаючи з другого, екстрагують шрот після видалення з нього попереднього розчинника, екстракцію здійснюють у 6 етапів послідовно водою при температурі 90-95 °С, розчинниками з діелектричною сталою відповідно 75-51, 50-26, 25-11, 10-1 при температурі 18-25 °С та підкисленим або підсоленим, або слаболужним водним розчином при температурі 60-80 °С [11].

Недоліком аналога є його багатостадійність, трудомісткість та довготривалість. Спосіб потребує додаткових енергозатрат та використання різних органічних розчинників, що не завжди економічно доцільно.

Відомий аналог є спосіб отримання сухого екстракту звіробою, який складається з таких етапів: екстрагування БАР з рослинної сировини ацетоном в апараті Сокслета (16-20 циклів) та випаровування екстракту під вакуумом до густого залишку; рослинну сировину, яка залишилася після екстрагування ацетоном, висушують та екстрагують 70 % етанолом (1:10) методом перколяції протягом 24 годин та упарюють до смолистого залишку; сировину знову сушать при 25-30 °С протягом 6 годин та проводять екстракцію БАР 30 % етиловим спиртом [8].

Недоліком аналога є складність, обумовлена довготривалістю, а також використання вогнебезпечних та токсичних розчинників.

Відомий аналог є спосіб одержання білково-полісахаридних комплексів імуномодулюючої дії з різних рослин, у тому числі трави фіалки, шляхом екстракції рослинної сировини водою, осадження суми полісахаридів різними дегідратуючими агентами з подальшою їх очисткою [9].

Проте, аналог не включає комплексну переробку сировини, а отже, не дозволяє виділити інші групи БАР з різноманітною фармакологічною активністю.

Найближчий аналог до корисної моделі є спосіб одержання засобу з антимікробною активністю з трави підмаренника справжнього шляхом попередньої обробки рослинної сировини хлороформом, багаторазовою екстракцією отриманого шроту органічним розчинником з наступним концентруванням, який відрізняється тим, що як рослинну сировину використовують траву підмаренника справжнього (*Galium verum* L.), екстракцію здійснюють етилацетатно-спиртовою сумішшю (8:2) з рециркуляцією екстрагента у замкненому циклі при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:10-1:15 при постійно підтримуваній температурі 70-75 °С протягом 12 годин [10].

Найближчий аналог обмежується отриманням етилацетатно-спиртового комплексу з трави підмаренника справжнього і не ставить за мету вилучення інших БАР зі шроту, який залишається.

Проведеними раніше дослідженнями встановлено, що хлороформний та етилацетатно-спиртовий витяги з трави маренки восьмилисткової *Asperula octonaria* Klokov родини маренові Rubiaceae Juss. виявляють достатньо високу антибактеріальну активність [5, 15]. Шрот, який залишається після отримання ліпофільних фракцій, містить значну кількість БАР і може бути використаний для отримання біологічно-активних субстанцій.

В основу корисної моделі поставлена задача розробка способу комплексної переробки трави маренки восьмилисткової для отримання засобу з імуномодулюючою дією.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі комплексної переробки рослинної сировини для отримання засобу з імуномодулюючою дією шляхом попередньої багаторазової послідовної обробки сировини органічними розчинниками, згідно з корисною моделлю, як сировину використовують траву маренки восьмилисткової (*Asperula octonaria* Klokov), як органічні розчинники використовують хлороформ, суміш етилацетат: спирт (8:2), екстракцію хлороформом здійснюють при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:8-1:10, етилацетатно-спиртовою сумішшю (8:2) - при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:10-1:13, та наступної екстракції водою - при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:4-1:5, трічі по 30 хвилин, а потім здійснюють видалення білково-полісахаридного комплексу при загальному співвідношенні водний витяг: 96 % етанол 1:3 та упарювання отриманого фільтрату до видалення екстрагенту.

Корисною моделлю передбачено, що як рослинна сировина використовується трава маренки восьмилисткової. Маренка восьмилисткова (*Asperula octonaria* Klokov) - багаторічна трав'яниста рослина родини маренові (Rubiaceae), яка застосовується в народній медицині як седативний засіб при неврозах, неврастенії, істеріях, депресії.

Експериментальним шляхом встановлено, що ефективним при здійсненні заявленого способу є використання трикратної екстракції сировини водою, співвідношення сировини до води 1:4-1:5 та одержанні витягу, який за об'ємом дорівнює масі сировини. При цьому, якщо співвідношення менше 1:4, то не забезпечується достатня екстракція БАР, що призводить до зниження фармакологічної активності та виходу цільового продукту. Якщо співвідношення більше 1:5, то це призводить до ускладнення та подовження технологічного процесу, збільшення енерговитрат. З метою зменшення витрат етанолу доцільним є концентрування водного витягу до 1/3 об'єму.

Одержують субстанцію рослинного походження з імуномодулюючою дією, нетоксичну, придатну до тривалого застосування.

Отримана субстанція являє собою темно-жовті блискучі кристали з характерним запахом.

Усі параметри заявленого способу визначено експериментальним шляхом з урахуванням біологічної активності одержаного засобу, ефективності, доступності та нешкідливості реактивів, практичного відтворення способу у промислових умовах. Сукупність ознак заявленого способу є новою, невідомою із джерел інформації.

Корисну модель виконують наступним чином.

Заготовлену у фазі цвітіння подрібнену траву маренки восьмилисткової піддають вичерпній екстракції хлороформом при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:8-1:10 та загальній тривалості екстракції - 12-15 годин при температурі 60 °С-65 °С (ліпофільний комплекс). Висушений на повітрі при кімнатній температурі шрот вичерпно екстрагують у замкненому циклі етилацетатно-спиртовою сумішшю (8:2) при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:10-1:13 протягом 12 годин при постійно підтримуваній температурі 75-80 °С (фенольний комплекс). Потім висушений на повітрі шрот заливають гарячою водою у співвідношенні 1:4-1:5 та витримують на водяному нагрівнику при температурі 90 °С протягом 30 хвилин. Екстракцію водою проводять трічі. Отримані водні витяги об'єднують, концентрують спочатку до об'єму, що відповідає масі сировини, а потім до 1/3 частини попереднього об'єму і концентрат додають до трикратного об'єму 96 % спирту етилового. Осад відфільтровують, а фільтрат упарюють до видалення екстрагенту і отримання сухого залишку. Одержують субстанцію рослинного походження з імуномодулюючою дією, нетоксичну, придатну до тривалого застосування.

Вихід цільового продукту становить 10,85 %.

Корисна модель забезпечує одержання із значним виходом ліпофільного та фенольного комплексів БАР із трави маренки восьмилисткової, які мають широкий спектр антимікробної дії та можуть бути використанні для створення засобів з антимікробною активністю [5, 15], білково-полісахаридного комплексу і комплексу з імуномодулюючою дією.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1. 1,0 кг заготовленої у фазу цвітіння і подрібненої трави маренки восьмилисткової завантажували у циркуляційний екстрактор, заливали 8,0 л хлороформу та вичерпно

екстрагували при постійно підтримуваній температурі 60 °С протягом 12 годин з рециркуляцією екстрагенту у замкненому циклі. Одержаний знежирений і висушений на повітрі шрот заливали етилацетатно-спиртовою сумішшю (8:2) і вичерпно екстрагували при постійно підтримуваній температурі 75 °С протягом 12 годин з рециркуляцією екстрагенту у замкненому циклі.

Висушений на повітрі при кімнатній температурі шрот тричі заливали по 1,0 л гарячої води ($t=90\text{ }^{\circ}\text{C}$) та витримували на киплячому водяному нагрівнику протягом 30 хвилин. Отримані витяги об'єднували та концентрували до об'єму 1,0 л, а потім до 300 мл, після чого осаджували полісахариди 900 мл 96 % спирту етилового, осад відфільтровували, фільтрат упарювали на роторно-вакуумному апараті до видалення екстрагенту і отримання сухого залишку.

Вихід цільового продукту становить 10,85 %.

Приклад 2. Імуномодуючу дію субстанції з трави маренки восьмилісткової, одержаного за заявленим способом, вивчали *in vitro* в реакції макрофагальної трансформації мононуклеарів периферичної крові [2, 4, 6, 12, 14]. Первинні культури імунокомпетентних клітин одержували з гепаринізованої крові донорів шляхом відстоювання при температурі 4-8 °С. Мононуклеарні клітини крові культивували в середовищі 199 з 10 % фетальної сироватки. До живильного середовища додавали по 100 ОД/см натрієвої солі бензилпеніциліну та стрептоміцину, а також амфотеріцин В. Сухі екстракти вносили до первинних культур імунокомпетентних клітин у кількості 5 мкг/мл, 50 мкг/мл і 100 мкг/мл та інкубували при 37 °С протягом 23 годин. З метою оцінки фагоцитарної активності макрофагів і їх попередників через 23 години культивування в культуру вносили референтний штам *Staphylococcus aureus*-209P, інактивований прогріванням.

Оцінку імуномодуючої дії сухих екстрактів на імунокомпетентні клітини проводили за наступними показниками:

- ПМТМ - показник макрофагальної трансформації мононуклеарів;
- фагоцитарний індекс (ФІ);
- фагоцитарне число.

Контроль включав постановку реакції макрофагальної трансформації мононуклеарів периферичної крові без додавання досліджуваних екстрактів. Випробування проводили п'ятикратно. Одержані показники статистично обробляли за допомогою програми "Microsoft Excel" [7]. Результати досліджень наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив сухого екстракту *Asperula octonaria* на показники макрофагальної трансформації й фагоцитарної активності гематогенних попередників макрофагів, $n=5$

Сухий екстракт	Концентрація, мкг/мл	ПМТМ, %	Фагоцитарний індекс, %	Фагоцитарне число
<i>Asperula octonaria</i>	5	45,0 \pm 3,4	58,5 \pm 4,1	10,8 \pm 1,1
	50	51,5 \pm 4,0*	63,1 \pm 2,2*	11,8 \pm 0,9*
	100	54,4 \pm 2,9*	68,7 \pm 3,6*	12,3 \pm 1,3*
Контроль	-	32,6 \pm 3,4	46,4 \pm 2,8	7,6 \pm 0,6

Примітка. * - $P < 0,05$ у порівнянні до показника контролю

Сухий екстракт значною мірою стимулює трансформаційну та фагоцитарну активність мононуклеарних клітин периферичної крові.

При використанні досліджуваної субстанції в дозі 100 мкг/мл відзначається максимальна стимуляція функціональної активності імунокомпетентних клітин. Так, екстракт *Asperula octonaria* збільшив трансформаційну активність мононуклеарів на 67 %, фагоцитарний індекс - на 48 % і фагоцитарне число - на 62 % у порівнянні з інтактним контролем.

Таким чином екстракт маренки восьмилісткової проявляє дозозалежну стимулюючу дію на трансформаційну та фагоцитарну активність макрофагів і їх мононуклеарних попередників.

Приклад 3. Гостру токсичність заявленої субстанції вивчали при внутрішньошлунковому введенні нелінійним білим мишам обох статей віком 2,0-2,6 місяців, маса яких становила 20-22 г. Тварин розподілили на 4 групи по 6 мишей у кожній: 1 група - контрольна - тварини, яким внутрішньошлунково вводили водний розчин 0,9 % NaCl; 2-4 групи - тварини, яким за допомогою зонду одноразово внутрішньошлунково вводили водний розчин субстанції маренки запашної в дозах, що відповідають різним класам токсичності речовин: 50 мг/кг, 500 мг/кг, 5000 мг/кг в об'ємі 0,8 мл кожна.

Спостерігали за тваринами протягом 14 діб. Оцінку гострої токсичності проводили за такими критеріями: загальний стан, особливості поведінки, інтенсивність та характер рухової

активності, споживання корму й води, стан шкіри та слизових оболонок, функціонування життєво важливих органів і систем, кількість тварин, що загинуло.

Експериментальні дані свідчать, що у мишей піддослідних груп (дози 50 мг/кг та 500 мг/кг) з боку центральної нервової системи, слизових оболонок, шкіри і шерсті не спостерігалось відмінностей від першої контрольної групи.

В групі тварин, які отримували водний розчин заявленої субстанції в дозі 5000,0 мг/кг спостерігались зміни з боку рухової активності: збільшення спонтанної рухової активності, рухливість м'язів спини, плечей, задніх кінцівок. Симптом зникав протягом 48 годин. Летальних випадків серед дослідних та контрольної груп мишей не спостерігали (табл. 2).

Таблица 2

Вивчення гострої токсичності субстанції трави
маренки запашної при внутрішньошлунковому введенні

Група тварин	Кількість тварин у групі	Кількість тварин, що загинули			ЛД ₅₀ , мг/кг
		Доза, мг/кг			
		50	500	5000	
Сухий екстракт A. octonaria	6	0	0	0	>5000
Контроль	6	0	0	0	-

Відсутність летальності у мишей, які отримували максимальну дозу даної субстанції (5000 мг/кг), дозволяє віднести її до V класу токсичності - практично нетоксичні речовини [3].

Таким чином, заявлено спосіб комплексної переробки трави маренки восьмилистокової шляхом попередньої багаторазової послідовної обробки рослинної сировини органічними розчинниками та водою для отримання засобу з імуномодулюючою дією. Заявлений спосіб простий, економічний, передбачає комплексну переробку доступної вітчизняної сировини, є екологічно безпечним і може бути здійснений на будь-якому фармацевтичному підприємстві зі стандартним обладнанням.

Комплекс БАР з трави маренки восьмилистокової, одержаний за заявленим способом, виявляє виражену імуномодулюючу дію, є практично нетоксичним і може бути використаний як лікарська субстанція при створенні лікарських засобів зазначеної дії.

Джерело інформації:

1. Воробьев А.А. Принципы классификации и стратегии применения иммуномодуляторов в медицине / А.А. Воробьев // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2002. - № 4. - С. 93-98.

2. Гарник Т.П. Стан системи фагоцитуючих макрофагів у хворих з синдромом хронічної втоми при лікуванні препаратами рослинного походження депривітом та імуноплюсом / Т.П. Гарник, В.М. Фролов, Н.А. Пересадін / Український медичний альманах. - 2008. - Т. 11, № 6. - С. 53-57.

3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / за редакцією член-кор. АМН України О.В. Стефанова. - К.: Авіцена, 2001. - С. 74-97.

4. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г.Н. Дранник // 2-е изд. - Москва: МИА. - 2006. - С. 193-202.

5. Исследование антибактериальной активности густых экстрактов травы *Asperula odorata* L. и *Asperula ostonaria* Klokov. / Юрченко Н.С, Ильина Т.В., Ковалева А.М., Кашпур Н.В. // Современные тенденции и перспективы развития фармацевтического образования и науки в России и за рубежом.: материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, 21-23 нояб. 2013 г. - Научно-практический журнал. - № 11, 2013. - Пермь. ПГФА. - С. 181-183.

6. Киселева Е.П. Использование микрометода для бласттрансформации лимфоцитов человека и животных / Е.П. Киселева, А.С. Цвейбах, Е.И. Гольдман, Н.В. Пигарева // Иммунология. - 1985. - № 1. - С. 76-78.

7. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич // Киев: Морион. - 2000. - 320 с.

8. Пат. 2067452 РФ. МПК6 А61 К35/78. Способ получения экстракта зверобоя / Р.М. Мухамедзянов, В.А. Кулавский, В.А. Пушкарев, Р.А. Хасанов (Россия). - № 93055781/14; заявл. 15.13.93; опубл. 10.10.96, Бюл. № 12.

9. Патент UA 34709 України на корисну модель, МПК А61К 36/00, А61Р 37/00 Спосіб одержання комплексу полісахаридів з мембраностабілізуючою та імуномодулюючою дією / НфаУ - № u200800489; заявл. 14.01.2008; опубл. 26.08.2008, Бюл. № 16.

10. Патент UA 65519 України на корисну модель, МПК А61К 36/00, А61К 135/00, А61Р 31/00
5 Спосіб одержання засобу з антимікробною активністю з трави підмаренника справжнього / НфаУ - № u201105767; заявл. 10.05.2011; опубл. 12.12.2011, Бюл. № 23.

11. Патент UA 78433 України на корисну модель, МПК А61К 36/00, В01Д 11/02 Спосіб комплексної переробки лікарської рослинної сировини / НфаУ - № u201206222; заявл. 23.05.2012; опубл. 25.03.2013, Бюл. № 6.

10 12. Сизякина Л.П. Справочник по клинической иммунологии / Л.П. Сизякина, И.И. Андреева. - Ростов на Дону: Изд-во Феникс, 2005. - 448 с.

13. Столяров И.Д. Иммунодиагностика и иммунокоррекция в клинической практике / И.Д. Столяров // СПб.: Сотис. - 2003. - 176 с.

15 14. Фролов В.М. Определение фагоцитарной активности моноцитов периферической крови у больных / В.М. Фролов, Н.А. Пересадин, И.Я. Пшеничный // Лаборат. дело. - 1990. - № 9. - С. 27-29.

15 15. Юрченко Н.С. Изучение антибактериальной активности липофильного комплекса травы *Asperula ostonaria* Klokov / Н.С. Юрченко, Т.В. Ильина, А.М. Ковалева // Гаммермановские чтения.: сборник науч. трудов науч.-метод. конф., 3-6 февр. 2014 г. - СПб. - 2014. - С. 107.

20

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб комплексної переробки рослинної сировини для отримання засобу з імуномодулюючою дією шляхом попередньої багаторазової послідовної обробки рослинної сировини органічними розчинниками, який **відрізняється** тим, що як сировину використовують траву маренки
25 восьмилистої (*Asperula ostonaria* Klokov), як органічні розчинники використовують хлороформ, етилацетат: спирт (8:2), екстракцію хлороформом здійснюють при загальному співвідношенні сировина : екстрагент 1:8-1:10, етилацетатно-спиртовою сумішшю (8:2) при загальному співвідношенні сировина : екстрагент 1:10-1:13, а потім висушений шрот піддають
30 екстракції водою - при загальному співвідношенні сировина : екстрагент 1:4-1:5, тричі по 30 хвилин, потім здійснюють видалення білково-полісахаридного комплексу шляхом висаджування за допомогою етилового спирту при загальному співвідношенні водний витяг : 96 % етанол 1:3 та упарювання отриманого фільтрату до видалення екстрагенту.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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