



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **70294** (13) **U**
(51) МПК

A61K 36/74 (2006.01)

A61K 135/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2011 12451</p> <p>(22) Дата подання заявки: 24.10.2011</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.06.2012</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.06.2012, Бюл.№ 11</p>	<p>(72) Винахідник(и): Грудько Ірина Володимирівна (UA), Кашпур Наталія Валеріївна (UA), Ковальова Алла Михайлівна (UA), Комісаренко Андрій Миколайович (UA), Ільїна Тетяна Василівна (UA), Абдулкафарова Ельміра Рамізівна (UA), Очкур Олександр Васильович (UA), Горяча Ольга Володимирівна (UA), Волянський Андрій Юрійович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002, Україна (UA)</p>
--	--

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІПОФІЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ АНТИМІКРОБНОЇ ДІЇ

(57) Реферат:

Спосіб одержання ліпофільного комплексу антимікробної дії шляхом багаторазової екстракції рослинної сировини хлорогеновими розчинниками з наступним упарюванням екстракту до видалення екстрагенту. Як сировину використовують траву буркуну лікарського (*Melilotus officinalis*) та/або траву буркуну білого (*Melilotus albus*). Екстракцію здійснюють хлороформом при загальному співвідношенні сировина : екстрагент - 1:(10-12), при постійно підтримуваній температурі 55-60 °С з рециркуляцією екстрагенту у замкненому циклі протягом 28-32 годин.

UA 70294 U

Корисна модель належить до хіміко-фармацевтичної галузі, а саме до способів одержання з рослинної сировини біологічно активних речовин (БАР) ліпофільної природи та їх комплексів з антимікробною дією, які можуть бути використані як активні субстанції при створенні лікарських препаратів зазначеної фармакологічної активності у різних лікарських формах.

5 Відомий спосіб одержання ліпофільного екстракту з природної сировини - обніжжя бджолиного [1], шляхом екстракції подрібненої сировини зрідженим газом дихлордифторметаном при тиску 4,5-5,5 кгс/см², що перевищує атмосферний, при співвідношенні сировина : екстрагент 1:5-1:6, температурі 18-25 °С протягом 2,75-3,25 годин з наступним видаленням екстрагента з екстракту при випарюванні. Спосіб передбачає рециркуляцію екстрагента у замкненому циклі.

10 До недоліків зазначеного способу можна віднести високу вартість та складність технологічного процесу, а також необхідність використання спеціального обладнання для проведення екстракції при високому тиску.

15 Відомий спосіб одержання ліпофільного екстракту грінделії розчепіреної з протимікробною та репаративною активністю [2]. Зазначений спосіб полягає у екстракції трави грінделії розчепіреної 50 %-вим етанолом у співвідношенні сировина : екстрагент 1:9-1:11 з подальшим упарюванням отриманого екстракту до водного залишку у вакуумі при температурі 85-90 °С, 6-8-ми кратною обробкою залишку хлороформом та упарюванням отриманої ліпофільної фракції до видалення хлороформу.

20 Недоліком наведеного способу є багатостадійність, що ускладнює його здійснення у виробничих умовах, надмірні витрати спирту етилового та хлороформу. При використанні як розчинника 50 %-го етанолу окрім ліпофільних сполук у розчин екстрагується комплекс інших біологічно активних речовин, у тому числі фенольні сполуки, глікозиди та ін., що потребує додаткових операцій по виділенню ліпофільних сполук із суміші.

25 Найближчим до заявленого за технологічними прийомами є спосіб одержання ліпофільного комплексу з рослинної сировини [3], що складається з екстракції сировини органічним розчинником при співвідношенні сировина : екстрагент 1:(5-20), вилучення розчинника шляхом упарювання екстракту, змішування отриманого залишку з водою, очистку хлорвмісними похідними вуглеводню з подальшим упарюванням під вакуумом. Як рослинну сировину використовують ромашку аптечну або календулу, або пижмо, або звіробій, або золотушник. Як органічний розчинник використовують ацетон або нижчі спирти - спирт метиловий, спирт етиловий, спирт пропіловий, спирт ізопропіловий, спирт бутиловий; як хлорвмісні похідні вуглеводню використовують хлороформ або хлористий метилен, або чотирихлористий вуглець.

30 До недоліків зазначеного способу слід віднести використання великих об'ємів органічних розчинників, що веде до здорожчання виробництва, та послідовність технологічних стадій, яка унеможливорює інтенсифікацію та спрощення процесу отримання цільового продукту.

35 Задачею корисної моделі є створення способу одержання засобу рослинного походження шляхом екстракції хлороформом трави буркуну лікарського та/або трави буркуну білого, в результаті чого одержують ліпофільний комплекс БАР з вираженою антимікробною дією.

40 Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі одержання ліпофільного комплексу антимікробної дії шляхом багаторазової екстракції рослинної сировини хлорорганічним розчинником з наступним упарюванням екстракту до видалення екстрагента, згідно з корисною моделлю, як сировину використовують траву буркуну лікарського (*Melilotus officinalis*) та/або траву буркуну білого (*Melilotus albus*), екстракцію здійснюють хлороформом при загальному співвідношенні сировина : екстрагент 1:(10-12), при постійно підтримуваній температурі 55-60 °С з рециркуляцією екстрагента у замкненому циклі протягом 28-32 годин.

45 Корисною моделлю передбачено, що як рослинну сировину використовують траву буркуну лікарського та/або траву буркуну білого. Буркун лікарський (*Melilotus officinalis*) та буркун білий (*Melilotus albus*) - дворічні трав'янисті рослини родини Fabaceae, які мають достатню сировинну базу у флорі України та культивуються як кормові культури, широко використовуються у народній медицині з лікувальною метою. Препарати буркуну лікарського і білого мають відхаркувальні, пом'якшувальні, седативні, болетамувальні, вітрогонні та антикоагулянтні властивості. Вони посилюють кровообіг, сприяють зменшенню набряків і усуненню запальних процесів [4]. Буркун лікарський також застосовується в офіційній медицині як кумариновмісна сировина [5]. Ліпофільний комплекс обох рослин представлено біологічно активними речовинами - хлорофілами, терпеноїдами, кумаринами та ароматичними сполуками.

50 Авторами вперше було досліджено антимікробну дію комплексу буркуну лікарського та буркуну білого, невідому з джерел інформації.

60 Вибір хлороформу як хлорорганічного розчинника при здійсненні заявленого способу обумовлено його здатністю максимально екстрагувати ліпофільні сполуки буркуну лікарського

та буркуну білого. У сучасному фітохімічному виробництві хлороформ широко застосовують як знежирюючий агент, але отримувані при цьому ліпофільні фракції не є цільовим продуктом та, найчастіше, у подальше виробництво не включаються.

Експериментальним шляхом встановлено, що оптимальним при здійсненні заявленого способу є використання співвідношення сировини до екстрагенту як 1 : (10-12). При цьому, якщо співвідношення менше 1:10, не забезпечується достатня екстракція БАР, що призводить до зниження фармакологічної активності та виходу цільового продукту. Навпаки, якщо співвідношення більше 1:12, це веде до ускладнення та подовження технологічного процесу, збільшення використання розчинника та енерговитрат. Екстракція протягом 28-32 годин забезпечує максимальне вилучення ліпофільних сполук з сировини.

Згідно з заявленим способом упарювання проводять до видалення екстрагента з подальшим отриманням густого екстракту.

Отриманий густий екстракт представляє собою темно-зелену в'язку масу з різким характерним запахом.

Заявлений спосіб здійснюють в умовах рециркуляції екстрагента у замкненому циклі, що запобігає виходу хлороформу в оточуюче середовище.

Сукупність ознак заявленого способу є новою, невідомою з джерел інформації.

Корисну модель здійснюють наступним чином. Сушу, подрібнену траву буркуну лікарського та/або буркуну білого, заготовлену у фазі цвітіння, завантажують у циркуляційний екстрактор, заливають хлороформом у співвідношенні сировина : екстрагент 1:(10-12) та вичерпно екстрагують при постійно підтримуваній температурі 55-60 °С протягом 28-32 годин з рециркуляцією екстрагента у замкненому циклі.

Новий спосіб здійснюють за простою технологією, яку можливо здійснити на стандартному заводському обладнанні, екстракцію проводять до повного вилучення ліпофільного комплексу БАР з сировини. Одержують субстанцію рослинного походження з ефективною антимікробною дією, нетоксичну, придатну до тривалого застосування без звикань та побічної дії. Для здійснення заявленого способу існує достатня вітчизняна сировинна база.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1. 1 кг заготовленої у фазі цвітіння і подрібненої трави буркуну лікарського завантажили у циркуляційний екстрактор, залили 10 л хлороформу та вичерпно екстрагували при постійно підтримуваній температурі 55 °С протягом 32 годин при загальному співвідношенні сировина : екстрагент 1:10 з рециркуляцією екстрагента у замкненому циклі до знебарвлення екстрагента. Отриманий екстракт упарили до видалення парів хлороформу у вакуумі до отримання густого екстракту.

Вихід ліпофільної фракції склав 7,04 %.

Приклад 2. 1 кг заготовленої у фазі цвітіння і подрібненої трави буркуну білого завантажили у циркуляційний екстрактор, залили 11 л хлороформу та вичерпно екстрагували при постійно підтримуваній температурі 57 °С протягом 28 годин при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:11 з рециркуляцією екстрагента у замкненому циклі до знебарвлення екстрагента. Отриманий екстракт упарили до видалення парів хлороформу у вакуумі до отримання густого екстракту.

Вихід ліпофільної фракції склав 7,06 %.

Приклад 3. 1 кг суміші, заготовленої у фазі цвітіння і подрібненої трави буркуну лікарського та буркуну білого, у рівних частках завантажили у циркуляційний екстрактор, залили 12 л хлороформу та вичерпно екстрагували при постійно підтримуваній температурі 60 °С протягом 32 годин при загальному співвідношенні сировина : екстрагент 1:12 з рециркуляцією екстрагента у замкненому циклі до знебарвлення екстрагенту. Отриманий екстракт упарили до видалення парів хлороформу у вакуумі до отримання густого екстракту.

Вихід ліпофільної фракції склав 7,1 %.

Приклад 4. Антимікробну дію ліпофільного комплексу трави буркуну лікарського та буркуну білого, отриманого за заявленим способом, вивчали у дослідях *in vitro* за відомими методиками [6, 7] методом дифузії в агар та методом серійних розведень. Для оцінки антимікробної активності досліджуваного ліпофільного комплексу використовували стандартні штами мікроорганізмів, регламентовані ВООЗ для вивчення антимікробної дії препаратів: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* 885-663. Для визначення антимікробної дії культури мікроорганізмів вирощували на м'ясо-пептонному агарі при $t=37$ °С. Термін культивування мікроорганізмів складав 24 години. Для кількісної оцінки антимікробної дії ліпофільних комплексів буркуну лікарського і буркуну білого та визначення їх

мінімальних пригнічуючих ріст мікроорганізмів концентрацій використовували метод серійних розведень.

Ліпофільні комплекси використовували у вигляді 2 % спиртових розчинів. Результати проведених досліджень наведені в табл. 1 і табл. 2.

5

Таблиця 1

Антимікробна дія ліпофільного комплексу буркуну лікарського, одержаного за заявленим способом

Тест - штами мікроорганізмів	Діаметр зон затримки росту в мм	*МБСК, мкг/мл	**МБцК, мкг/мл
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	24,4±0,3	62,5	125
<i>E. coli</i> ATCC 25922	x	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	18,3±0,1	125	250
<i>P. vulgaris</i> ATCC 4636	14,2±0,3	250	500
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	20,3±0,2	125	250
<i>C. albicans</i> ATCC 885-663	x	-	-

*МБСК - мінімальна бактериостатична концентрація **МБцК - мінімальна бактерицидна концентрація X - зони затримки росту мікроорганізмів не спостерігається

Таблиця 2

Антимікробна дія ліпофільного комплексу буркуну білого, одержаного за заявленим способом

Тест - штами мікроорганізмів	Діаметр зон затримки росту в мм	*МБСК, мкг/мл	**МБцК, мкг/мл
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	18,4±0,2	125	250
<i>E. coli</i> ATCC 25922	x	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	14,3±0,1	125	500
<i>P. vulgaris</i> ATCC 4636	26,0±0,2	62,5	125
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	21,2±0,2	125	250
<i>C. albicans</i> ATCC 885-663	10,0±0,1	250	500

*МБСК - мінімальна бактериостатична концентрація **МБцК - мінімальна бактерицидна концентрація X - зони затримки росту мікроорганізмів не спостерігається

Аналіз даних таблиці 1 свідчить про те, що діаметри зон затримки росту по відношенню до *S.aureus*, *E.coli* *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* та *B.subtilis* складають 14-24 мм, що свідчить про чутливість мікроорганізмів до ліпофільного комплексу трави буркуну лікарського, який має виражену антимікробну дію по відношенню до грам-позитивних та грам-негативних бактерій. Досліджуваний комплекс виявився не активним по відношенню до *C albicans* та *E. coli*.

10

Аналіз даних таблиці 2 свідчить про те, що діаметри зон затримки росту по відношенню до *S.aureus*, *E.coli* *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* та *B.subtilis* складають 10-26 мм, що свідчить про чутливість мікроорганізмів до ліпофільного комплексу трави буркуну білого, який має виражену антимікробну дію по відношенню до грам-позитивних та грам-негативних бактерій. Досліджуваний комплекс виявився неактивним лише по відношенню до *E. coli*.

15

Таким чином, заявлено спосіб одержання ліпофільних комплексів з антимікробною дією з трави буркуну лікарського та/або трави буркуну білого. Заявлений спосіб простий, економічний, передбачає використання доступної вітчизняної сировини, є екологічно безпечним і може бути здійснений на будь-якому фармацевтичному підприємстві зі стандартним обладнанням. Ліпофільний комплекс БАР, одержаний заявленим способом, може бути використаний як лікарська субстанція для створення препаратів з антимікробною дією у різних лікарських формах.

20

25

Джерела інформації:

1. Пат. 25670А Україна, Заявл. 30.12.1997, Опубл. 25.12.1998, Бюл. № 6/1998.
2. Пат. 31032А, Україна, Заявл. 02.07.1998, Опубл. 15.12.2000, Бюл. № 7, 2000 р.
3. Пат. 64075КА, Україна, Заявл. 21.08.2002, Опубл. 16.02.2004, Бюл. № 2, 2004 р.

4. Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник. За ред... А.М. Гродзинського. Головна редакція Української радянської енциклопедії ім. М.П. Бажана. - К.:1991. - С. 72-73.

5. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Scrophulariaceae-Plantaginaceae. - Л.: Наука, 1990. - 326 с.

6. Методические рекомендации определения активности антибактериальных средств наружного применения для лечения гнойно-воспалительных инфекций: Метод, реком. / Калиниченко Н.Ф., Волянский Ю.Л., Старобинец З.Г. и соавторы / Харьков, 1991. - 16 с.

7. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: Метод. Реком. / Волянський Ю.Л., Гриценко І.С., Ширококов В.П. і співавт. - К., 2004. - 40 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання ліпофільного комплексу антимікробної дії шляхом багаторазової екстракції рослинної сировини хлороформним розчинником з наступним упарюванням екстракту до видалення екстрагента, який **відрізняється** тим, що як сировину використовують траву буркуну лікарського (*Melilotus officinalis*) та/або траву буркуну білого (*Melilotus albus*), екстракцію здійснюють хлороформом при загальному співвідношенні сировина : екстрагент - 1:(10-12), при постійно підтримуваній температурі 55-60 °С з рециркуляцією екстрагента у замкненому циклі протягом 28-32 годин.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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