



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86541** (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 2013 03976</p> <p>(22) Дата подання заявки: 01.04.2013</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.01.2014</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.01.2014, Бюл.№ 1</p>	<p>(72) Винахідник(и): Юрченко Наталія Сергіївна (UA), Ільїна Тетяна Василівна (UA), Горяча Ольга Володимирівна (UA), Кашпур Наталія Валеріївна (UA), Ковальова Алла Михайлівна (UA), Волянський Андрій Юрійович (UA), Очкур Олександр Васильович (UA), Кірсєв Ігор Володимирович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)</p>
---	--

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІПОФІЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ З АНТИМІКРОБНОЮ АКТИВНІСТЮ

(57) Реферат:

Спосіб одержання ліпофільного комплексу з антимікробною активністю шляхом багаторазової екстракції рослинної сировини з рециркуляцією екстрагенту у замкненому циклі, з використанням як екстрагенту - хлороформу. Потім упарюють до видалення екстрагенту і отримують сухий залишок. Як сировину використовують траву маренки сланкої. Екстракцію здійснюють до знебарвлення розчинника.

UA 86541 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 Важливою проблемою сучасної медицини є лікування захворювань, викликаних патогенними мікроорганізмами, здатними уражати різні органи і системи людського організму. Все частіше спостерігається резистентність основних збудників інфекційних захворювань до вже відомих антибактеріальних препаратів. Офіційна медицина практично не має ефективних та безпечних антибактеріальних засобів рослинного походження. Тому перспективними для пошуку таких засобів є ліпофільні комплекси БАР з певних видів рослинної сировини.

10 Відомий спосіб одержання засобу з антимікробною активністю з листя евкалипту прутувидного [1] шляхом трикратної екстракції рослинної сировини 96 % спиртом етиловим або етилацетатом при співвідношенні сировина:екстрагент 1:3-1:20 протягом доби з подальшими фільтрацією та упарюванням об'єднаного екстракту до 1/20-1/22 попереднього об'єму, очищенням екстракту шляхом розчинення в 3-кратній кількості гексану або бензин-калоші та додавання 4 % розчину сульфату міді. Вихід цільового продукту - 10,5 %.

15 Недоліками наведеного способу є багатостадійність, надмірні витрати токсичних органічних розчинників (гексану або бензин-калоші) та використання імпортової сировини - листя евкалипту, що ускладнює одержання засобу, робить більш небезпечним процес отримання екстракту та веде до здорожчання виробництва.

20 Відомий спосіб одержання двох комплексів БАР - ліпофільного та фенольного, які проявляють антимікробну, протизапальну та репаративну активність із бруньок тополі китайської [2] шляхом послідовного вилучення з рослинної сировини ліпофільного комплексу методом вичерпного екстрагування хлороформним розчинником, переважно хлороформом, при співвідношенні сировина: екстрагент 1:9-1:10, подальшим упарюванням витяжки до видалення розчинника при температурі 60-70 °С, з наступним отриманням фенольного комплексу, шляхом трикратної екстракції висушеної знежиреної сировини 50-65 % етанолом при нагріванні до 60-80 °С, протягом 30 хвилин, при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:10 з наступним об'єднанням спиртових витягів, упарюванням та сушкою для одержання фенольного комплексу.

25 Недоліком зазначеного способу є багатостадійність, що ускладнює його здійснення у виробничих умовах, та довготривалість технологічного процесу, використання великих об'ємів спирту етилового.

30 Найближчим до заявленого способу за сукупністю ознак є спосіб одержання ліпофільного комплексу антимікробної дії [3], згідно з яким як сировину використовують траву підмаренника справжнього (*Galium verum* L.), екстракцію здійснюють хлороформом при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:10-1:12, з рециркуляцією екстрагента у замкненому циклі протягом 28-32 годин, з наступним упарюванням та видаленням екстрагенту і отриманням сухого залишку.

40 Ліпофільний комплекс, отриманий із зазначеної сировини, а саме трави підмаренника справжнього (*Galium verum* L.), має достовірну антимікробну дію. Недоліком зазначеного способу є використання великих об'ємів органічного розчинника, довготривалість технологічного процесу, що веде до збільшення вартості цільового продукту.

45 Задача корисної моделі є створення способу одержання засобу рослинного походження, а саме ліпофільного комплексу БАР з широким спектром антимікробної дії.

50 Поставлена задача вирішується тим, що у способі одержання ліпофільного комплексу з антимікробною дією шляхом багаторазової екстракції рослинної сировини з рециркуляцією екстрагента у замкненому циклі, з використанням як екстрагенту - хлороформу, та наступним упарюванням до видалення екстрагента і отриманням сухого залишку, згідно з корисною моделлю, як сировину використовують траву маренки сланкої (*Asperula humifusa* (M.B.) Bess.), екстракцію здійснюють при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:8-1:10 до знебарвлення розчинника при постійно підтримуваній температурі 50-65 °С протягом 25-27 годин.

55 Корисною моделлю передбачено, що як рослинна сировина використовується трава маренки сланкої. Маренка сланка (*Asperula humifusa* (M.B.) Bess.) - багаторічна трав'яниста рослина родини маренові (*Rubiaceae* Juss.), широко використовується у народній медицині при пневмонії, ендометриті, гепатиті, захворюванні нирок, викликаних травмою, діареї, ентероколітах та внутрішніх кровотечах [4].

60 Авторами встановлено виражену антимікробну дію ліпофільного комплексу, одержаного з іншої рослинної сировини - маренки сланкої (*Asperula humifusa* (M.B.) Bess.).

Компонентний склад хлороформного екстракту рослини представлено біологічно активними речовинами, що мають виражені антимікробні властивості - хлорофілами, терпеноїдами, стероїдними та ароматичними сполуками.

Всі ознаки заявленого способу були визначені дослідним шляхом.

5 Вибір хлороформу як хлорорганічного розчинника для здійснення заявленого способу обумовлений його здатністю максимально екстрагувати ліпофільні сполуки з вибраної рослинної сировини. Інші знежирюючі розчинники, наприклад, петролейний ефір, діетиловий ефір та інші не забезпечують повне виділення ліпофільного комплексу з трави маренки сланкої.

10 У сучасному фітохімічному виробництві хлороформ широко застосовують як знежирюючий агент, проте найчастіше отримані при цьому ліпофільні фракції не є цільовим продуктом та у подальше виробництво не включаються. Тож заявлений спосіб залишає можливість комплексної переробки такої сировини, як трава маренки сланкої, шляхом екстрагування знежиреного шроту іншими розчинниками з метою одержання інших, зокрема фенольних, фракцій.

15 Експериментальним шляхом встановлено, що оптимальним при здійсненні заявленого способу є використання співвідношення сировини до екстрагенту як 1:8-1:10. При цьому, якщо співвідношення менше 1:8, не забезпечується достатня екстракція БАР, що приводить до зниження фармакологічної активності та виходу цільового продукту. Навпаки співвідношення більше 1:10 веде до ускладнення та подовження технологічного процесу, збільшення використання розчинника та енерговитрат. Екстракція протягом 25-27 годин забезпечує максимальне вилучення ліпофільних сполук з сировини.

20 Згідно з заявленим способом упарювання проводять до видалення екстрагенту з подальшим отриманням сухого залишку.

Отриманий залишок являє собою темно-зелену масу із різким характерним запахом.

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

Спосіб здійснюють за простою технологією, яку можливо відтворити на стандартному заводському обладнанні наступним чином. Заготовлену у фазі цвітіння подрібнену траву маренки сланкої завантажують у циркуляційний екстрактор, заливають хлороформом та вичерпно екстрагують при постійно підтримуваній температурі 50-65 °С протягом 25-27 годин при загальному співвідношенні сировини до екстрагенту 1: 8-1:10 з рециркуляцією екстрагенту у замкненому циклі до знебарвлення екстрагенту. Отриманий екстракт упарюють до видалення парів хлороформу у вакуумі до отримання сухого залишку. Одержують субстанцію рослинного походження з широким спектром антимікробної дії, нетоксичну, придатну до тривалого застосування без формування резистентності патогенних мікроорганізмів. Для здійснення заявленого способу існує достатня вітчизняна сировинна база.

Корисна модель ілюструється прикладами.

40 Приклад 1. 1 кг заготовленої у фазу цвітіння і подрібненої трави маренки сланкої завантажили у циркуляційний екстрактор, залили 8 л хлороформу та вичерпно екстрагували при постійно підтримуваній температурі 65 °С протягом 25 годин при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:8 з рециркуляцією екстрагенту у замкненому циклі до знебарвлення екстрагенту. Отриманий екстракт упарювали до видалення парів хлороформу у вакуумі до отримання сухого залишку.

Вихід цільового продукту становить 3,23 %.

45 Приклад 2.

Антибактеріальну активність хлороформного екстракту трави маренки сланкої, отриманого за заявленим способом, досліджували *in vitro* методом дифузії в агар (метод "колодязів") [5, 6]. Ступінь чутливості мікроорганізмів оцінювали за розміром зон затримки росту. Мікробне навантаження складало 10^7 мікробних клітин на 1 мл середовища і визначалось візуально за оптичним стандартом каламутності McFarland.

50 Для оцінки активності 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 ліпофільного комплексу та визначення мінімальної пригнічуючої рiст мікроорганізмів концентрації використовували метод серійних розведень.

60 Ліпофільний комплекс використовували у вигляді 2 % спиртового розчину. Результати проведених досліджень наведені в табл. 1.

Специфічна активність ліпофільного комплексу трави маренки сланкої, 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	33,3±0,2	31,25	62,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	13,4±0,2	250	500
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	33,3±0,2	31,25	62,5
<i>P. vulgaris</i> ATCC 4636	16,0±0,2	250	500
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	24,0±0,1	125	250
<i>C. albicans</i> ATCC 885-663	X	-	-

Примітка: *МБсК - мінімальна бактеріостатична концентрація; **МБцК - мінімальна бактерицидна концентрація; X - зони затримки росту мікроорганізмів не спостерігається.

5 Аналіз даних таблиці 1 свідчить про те, що ліпофільний комплекс трави маренки сланкої має виражену протимікробну дію до *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *B.subtilis* та помірну антимікробну дію по відношенню до *E.coli* та *P.vulgaris*. Даний спосіб отримання засобу антимікробної дії з трави маренки сланкої відрізняється від прототипу тим, що отриманий ліпофільний комплекс має значно вищу антимікробну активність стосовно *Pseudomonas aeruginosa* та проявляє мінімальні

10 бактеріостатичну та бактерицидну дію в дозі вдвічі нижчій, ніж у прототипі. Тобто, ліпофільний комплекс трави маренки сланкої має виражену антимікробну дію по відношенню до грам-позитивних та грам-негативних бактерій. Досліджуваний комплекс виявився не активним лише по відношенню до *C. albicans*.

15 Отже, ліпофільний комплекс трави маренки сланкої є новою високоефективною субстанцією рослинного походження з широким спектром антимікробної дії.

20 Таким чином, заявлено спосіб одержання хлороформного витягу з трави маренки сланкої з антимікробною дією. 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 з трави маренки сланкої, одержаний за заявленим способом, може бути використаний як лікарська субстанція при створенні антибактеріальних препаратів широкого спектра дії у різних лікарських формах.

Джерела інформації:

25 1. Україна, Пат. № 89926 UA, МПК (2009) А61К36/61 (2006.01), А61Р31/00 / КОМІСАРЕНКО А. М.-З. № а200903866, заявл. 21.04.2009; опубл. 10.03.2010. Спосіб одержання засобу з антимікробною активністю з листя евкаліпту.

30 2. Україна, Пат. № 56037 UA, МПК(2009) А61К 36/76 (2006.01), А61Р 17/00 /НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ - З. № U201006279, заявл. 25.05.2010, опубл. 27.12.2010. Спосіб одержання біологічно активних речовин з антимікробною, протизапальною та репаративною активністю

3. Україна, Пат. 64792 UA, МПК А61К 36/74 (2006.01), А61К 135/00 (2006.01), А61Р 31/04 (2006.01) /НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ - З. № и201102089, заявл. 22.02.2011, опубл. 25.11.2011. Спосіб одержання ліпофільного комплексу антимікробної дії.

35 4. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Saprifoliaceae-Plantaginaceae. - Л.:Наука, 1990. - 326 С.

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

40 6. Решедько Г.К., Стецюк О.У. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузным методом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2001. - Т. 3, № 4. - С. 348-355.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

45 Спосіб одержання ліпофільного комплексу з антимікробною активністю шляхом багаторазової екстракції рослинної сировини з рециркуляцією екстрагенту у замкненому циклі, з використанням як екстрагенту - хлороформу, та з наступним упарюванням до видалення екстрагенту і отриманням сухого залишку, який **відрізняється** тим, що як сировину

використовують траву маренки сланкої (*Asperula humifusa* (M.B.) Bess.), екстракцію здійснюють при загальному співвідношенні сировина:екстрагент - 1:8-1:10 до знебарвлення розчинника при постійно підтримуваній температурі 50-65 °С протягом 25-27 годин.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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