



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 104170

(13) C2

(51) МПК

A61K 36/48 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

- (21) Номер заявки: а 2011 12454
(22) Дата подання заявки: 24.10.2011
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.01.2014
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.04.2013, Бюл.№ 8
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.01.2014, Бюл.№ 1

- (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)

- (73) Власник(и):
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002,
Україна (UA)

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
UA 3544 U, 15.2004
UA 9524 U, 17.10.2005
RU 2 223 110 C1, 10.02.2004
RU 2 183 463 C2, 20.06.2002
CN 101371870 A, 25.02.2009
CN 102178725 A, 14.09.2011

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З АНТИМІКРОБНОЮ ДІЄЮ З ТРАВИ БУРКУНУ

(57) Реферат:

Винахід належить до хіміко-фармацевтичної галузі, а саме до способів одержання з рослинної сировини біологічно активних речовин (БАР) ліпофільно-фенольної природи та їх комплексів з антимікробною дією. Як сировину використовують траву буркуну лікарського (*Melilotus officinalis*) та/або траву буркуну білого (*Melilotus albus*), а як екстрагент – етилацетат.

UA 104170 C2

Винахід належить до хіміко-фармацевтичної галузі, а саме до способів одержання з рослинної сировини біологічно активних речовин (БАР) ліпофільної та фенольної 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.

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 екстрагенту з екстракту при випарюванні. Спосіб передбачає рециркуляцію екстрагенту у замкненому циклі.

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

Відомий спосіб одержання екстракту гринделії розчепіреної з протимікробною та репаративною активністю [2]. Зазначений спосіб полягає у екстракції трави гринделії розчепіреної 50 %-им 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-кратною обробкою залишку хлороформом та упарюванням отриманої ліпофільної фракції до видалення хлороформу.

Недоліком наведеного способу є багатостадійність, що ускладнює його здійснення у виробничих умовах, надмірні витрати спирту етилового та хлороформу.

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 залишку 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.

До недоліків зазначеного способу слід віднести використання великих об'ємів органічних розчинників, що веде до здорожчання виробництва, та послідовність технологічних стадій, яка унеможливує інтенсифікацію та спрощення процесу отримання цільового продукту. Спосіб забезпечує одержання ліпофільних комплексів, відкидаючи БАР фенольної природи.

Задачею винаходу є створення способу одержання засобу рослинного походження шляхом екстракції етилацетатом трави буркуну лікарського та/або буркуну білого, в результаті чого одержують комплекс БАР, що містить ліпофільні та фенольні сполуки, з вираженою антимікробною дією.

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

Винаходом передбачено, що як рослинна сировина використовується трава буркуну лікарського або трава буркуну білого. Буркун лікарський (*Melilotus officinalis*) та буркун білий (*Melilotus albus*) - дворічні трав'янисті рослина 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 застосовується як кумариновмісна сировина [5]. Ліпофільно-фенольні комплекси рослин представлено біологічно активними - хлорофілами, терпеноїдами, кумаринами та ароматичними сполуками.

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

Вибір етилацетату обумовлений його здатністю максимально екстрагувати ліпофільні та фенольні речовини: хлорофіли, терпеноїди, прості феноли, гідроксикумарини, аглікони і монозиди флавоноїдів буркуну лікарського та буркуну білого.

Експериментальним шляхом встановлено, що оптимальним при здійсненні заявленого способу є використання співвідношення сировини до екстрагенту як 1:10-1:12. 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 та фенольних сполук з сировини.

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

Отриманий густий екстракт являє собою темно-зелену в'язку масу з приємним кумариновим запахом.

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

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

Винахід здійснюють наступним чином. Суху, 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 °C протягом 28-32 годин з рециркуляцією екстрагента у замкнутому циклі.

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

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1

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

Вихід готового продукту склав 6,59 %.

Приклад 2

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

Вихід готового продукту склав 7,03 %.

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 етилацетату та вичерпно екстрагували при постійно підтримуваній температурі 60 °C протягом 32 годин при загальному співвідношенні сировина: екстрагент 1:12 з рециркуляцією екстрагента у замкнутому циклі до знебарвлення екстрагенту. Отриманий екстракт упарили до видалення парів хлороформу у вакуумі до отримання густого екстракту.

Вихід готового продукту склав 7,08 %.

Приклад 4

Антимікробну дію ліпофільно-фенольного комплексу трави буркуну лікарського та буркуну білого, отриманих за заявленим способом, вивчали у дослідях *in vitro* за відомими методиками [6, 7] методом дифузії в агар та методом серійних розведень. 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'ясопептонному агарі при $t=37^{\circ}\text{C}$. Термін культивування мікроорганізмів складав 24 години. Для кількісної оцінки антимікробної дії ліпофільно-фенольних комплексів буркуну лікарського та буркуну білого, одержаних за заявленим способом, та визначення їх мінімальної пригнічуючої рiст мікроорганізмів концентрації використовували метод серійних розведень.

Ліпофільно-фенольний комплекс використовували у вигляді 2 % спиртових розчинів. Результати проведених досліджень наведені в табл. 1 і табл. 2.

Таблиця 1

Антимікробна дія ліпофільно-фенольного 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	28,3 \pm 0,1	31,25	62,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	13,2 \pm 0,2	250	500
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	22,0 \pm 0,3	125	250
<i>P. vulgaris</i> ATCC 4636	13,1 \pm 0,2	250	500
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	24,0 \pm 0,4	125	250
<i>C. albicans</i> ATCC 885-663	x	-	-

*МБсК - мінімальна бактеріостатична концентрація

**МБцК - мінімальна бактеріцидна концентрація

x - зони затримки росту мікроорганізмів не спостерігається

Таблиця 2

Антимікробна дія ліпофільно-фенольного 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	30,3 \pm 0,4	31,25	62,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10,0 \pm 0,2	500	1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	14,1 \pm 0,3	250	500
<i>P. vulgaris</i> ATCC 4636	26,3 \pm 0,4	62,5	125
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	22,2 \pm 0,2	125	250
<i>C. albicans</i> ATCC 885-663	16,3 \pm 0,2	125	250

*МБсК - мінімальна бактеріостатична концентрація

**МБцК - мінімальна бактеріцидна 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 13,1-28,3 мм, що вказує на чутливість мікроорганізмів до ліпофільно-фенольного екстракту буркуну лікарського. Отже, ліпофільно-фенольний комплекс трави буркуну лікарського має виражену антимікробну дію по відношенню до грам-позитивних та грам-негативних бактерій. Досліджуваний комплекс виявився не активним лише по відношенню до *Candida albicans*.

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 10-30,3 мм, що вказує на чутливість мікроорганізмів до ліпофільно-фенольного екстракту буркуну білого. Таким чином, ліпофільно-фенольний комплекс трави буркуну білого має виражену антимікробну дію по відношенню до всіх досліджуваних штамів грам-позитивних, грам-негативних бактерій та грибів *Candida albicans*.

Таким чином, заявлено спосіб одержання ліпофільно-фенольних комплексів з трави буркуну лікарського або трави буркуну білого з антимікробною дією, які мають достатню сировинну базу у флорі України та культивуються як кормові культури. Заявлений спосіб простий, економічний, передбачає використання доступної вітчизняної сировини, є екологічно безпечним і може бути здійснений на будь-якому фармацевтичному підприємстві зі стандартним обладнанням.

Ліпофільно-фенольний комплекс БАР, одержаний заявленим способом, може бути використаний як лікарська субстанція для створення препаратів з антимікробною дією у різних лікарських формах.

Джерела інформації:

- 5 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, 2000р.
3. Пат. 64075КА, Україна, Заявл. 21.08.2002, Опубл. 16.02.2004, Бюл. № 2, 2004р.
4. Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник. За ред. А.М. Гродзинського. Головна редакція Української радянської енциклопедії ім. М.П. Бажана, Київ. - 1991. - С. 72-73.
- 10 5. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Carifoliaceae-Plantaginaceae. - Л.: Наука, 1990. - 326с.
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. - 16с.
- 15 7. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: Метод. реком. / Волянський Ю.Л., Гриценко І.С., Ширококов В.П. і співавт. - Київ, - 2004. - 40 с.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

- 20 Спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з антимікробною дією шляхом багаторазової екстракції рослинної сировини органічним розчинником з наступним упарюванням до видалення екстрагенту, який **відрізняється** тим, що як сировину використовують траву буркуну лікарського (*Melilotus officinalis*) та/або траву буркуну білого (*Melilotus albus*), екстракцію здійснюють етилацетатом при загальному співвідношенні сировина:екстрагент - 1:(10-12) при постійно підтримуваній температурі 55-60 °С з рециркуляцією екстрагенту у замкнутому циклі протягом 28-32 годин.
- 25

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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