



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **95122** (13) **U**
(51) МПК
A61K 36/38 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 07325	(72) Винахідник(и): Осьмачко Аліна Петрівна (UA), Ковальова Алла Михайлівна (UA), Ільїна Тетяна Василівна (UA), Кашпур Наталія Валеріївна (UA), Комісаренко Андрій Миколайович (UA), Кошовий Олег Миколайович (UA), Горяча Ольга Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 01.07.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.12.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.12.2014, Бюл.№ 23	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЛІПОФІЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ З АНТИМІКРОБНОЮ АКТИВНІСТЮ З ТРАВИ ВЕРОНІКИ ДОВГОЛИСТОЇ

(57) Реферат:

Спосіб одержання ліпофільного комплексу з антимікробною активністю включає багаторазову екстракцію рослинної сировини з рециркуляцією екстрагента у замкненому циклі, з використанням неполярного органічного розчинника, та з наступним упарюванням до видалення екстрагента і отримання сухого залишку. Як сировину використовують траву вероніки довголистої (*Veronica longifolia* L.), екстракцію здійснюють до знебарвлення розчинника при постійно підтримуваній температурі 50-60 °С протягом 30-36 годин.

UA 95122 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.

Відомі способи одержання ліпофільних комплексів з рослинної сировини ромашка аптечна, календула, пижмо, звіробій, золотушник, за допомогою органічних розчинників при співвідношенні сировина:екстрагент 1:(5-20), з подальшим вилученням розчинника, змішуванням отриманого залишку з водою, очисткою хлорвмісними похідними вуглеводню з подальшим упарюванням під вакуумом [2].

Відомий спосіб отримання ліпофільного комплексу лядвенцю рогатого шляхом послідовного використання для екстракції спочатку органічного розчинника, переважно спирту етилового різної концентрації, а потім хлороформу, яким обробляють водний залишок після видалення органічного розчинника [6].

Відомий спосіб одержання екстракту grindelії розчепіреної з антимікробною та репаративною активністю, який полягає в екстракції сировини 50 % етанолом у співвідношенні сировина-екстрагент 1:9-1:11 з подальшим упарюванням до водного залишку у вакуумі ($t=85-90^{\circ}\text{C}$) та подальшою обробкою хлороформом та його видаленням [3].

Наведені способи отримання ліпофільних комплексів з кори осики [4], при співвідношенні сировина:екстрагент 1:8 та з бруньок тополі китайської [7], при співвідношенні сировина:екстрагент 1:(9-10), шляхом безпосередньої екстракції рослинної сировини хлорорганічним розчинником, переважно хлороформом, з наступним упарюванням одержаного екстракту до видалення екстрагенту.

Зазначений спосіб одержання концентрату для виготовлення реп'яхової олії, який полягає в триразовій екстракції органічним розчинником (хлороформ, хлористий метилен), при співвідношенні сировина-екстрагент 1:10, відгоні розчинника та додаванні екстракту при перемішуванні у маслинову, соняшникову або кукурудзяну олію в співвідношенні 1:1000, з додаванням антиоксиданту вітаміну Е [5].

Описаний спосіб отримання фітозасобу з листя скумпії звичайної з попередньою очисткою та екстракцією етиловим спиртом при співвідношенні 1:15-1:20 з наступним ліофільним сушенням кінцевого продукту [1].

Недоліками наведених вище способів є використання великих об'ємів органічних розчинників або використання двох екстрагентів, складний технологічний процес, який неможливо скоротити задля отримання кінцевого продукту.

Найближчим аналогом було обрано спосіб одержання екстракту з рослинної сировини (трава полину) з протимікробною активністю, який полягає у екстракції рослинної сировини 80 % етанолом у співвідношенні сировина-екстрагент 1:10-1:15 з подальшим очищенням отриманого екстракту шляхом розчинення в 3-кратній кількості гексану або бензину калоші, та додаванням 4 % розчину міді сульфату, промиванням гексанового шару водою та упарюванням до густого екстракту. [8].

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

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу одержання засобу рослинного походження, а саме ліпофільного комплексу БАР з вираженою антимікробною дією.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі отримання ліпофільного комплексу з антимікробною дією, який включає багаторазову екстракцію рослинної сировини з рециркуляцією екстрагента у замкненому циклі, з використанням неполярного органічного розчинника, та наступним упарюванням до видалення екстрагента і отриманням сухого залишку, в якому згідно з корисною моделлю в якості сировини використовують траву вероніки довголистої (*Veronica longifolia* L.), екстракцію здійснюють до знебарвлення розчинника при постійно підтримуваній температурі $50-60^{\circ}\text{C}$ протягом 30-36 годин.

Рослинна сировина - вероніка довголиста (*Veronica longifolia* L.) є багаторічною трав'янистою рослиною роду подорожникові (*Plantaginaceae* L.), має значну сировинну базу на території України та культивується, як декоративна рослина. Вероніка довголиста є неофіційною рослиною, проте широко використовується у народній медицині при захворюваннях верхніх дихальних шляхів, як відхаркувальний та протизапальний засіб, шлунково-кишечного тракту, як жовчогінний та спазмолітичний засіб, та захворюваннях шкіри, як гемостатик та ранозагоювальний засіб. При цьому, частіше використовували надземну частину у вигляді спиртових настоек або відварів.

Авторами встановлено виражену антимікробну дію ліпофільного комплексу, одержаного з вероніки довголистої, невідому з джерел інформації.

Ліпофільний комплекс представлений БАР, що мають виражені антимікробні властивості - хлорофілами, терпеноїдами, іридоїдами, кумаринами, агліконами і монозидами флавоноїдів та ароматичними сполуками.

Всі ознаки заявленого способу були визначені дослідним шляхом.

5 Обраний органічний розчинник володіє здатністю максимально екстрагувати ліпофільні сполуки з обраної рослинної сировини та забезпечує повне виділення ліпофільного комплексу, вихід цільового продукту - 4,88 %. Отриманий екстракт зеленого кольору, з трав'яним запахом.

10 У сучасному фітохімічному виробництві отриманні ліпофільні фракції за допомогою органічних розчинників не є цільовим продуктом та у подальше виробництво не включаються. Тож заявлений спосіб залишає можливість комплексної переробки шроту з вероніки довголистої, з метою отримання інших, зокрема фенольних фракцій.

15 Експериментальним шляхом встановлено, що оптимальним при здійсненні заявленого способу є використання співвідношення сировини до екстрагенту як 1:10. При цьому, якщо співвідношення менше 1:10, відбувається недостатня екстракція БАР, що призводить 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 30-36 годин забезпечує максимальне вилучення ліпофільних сполук з сировини.

20 Уварювання екстракту проводять до видалення екстрагенту (1/15-1/20 від первинного об'єму) з подальшим отриманням сухого залишку. При більшому уварюванні залишок має більшу в'язкість та зменшується його текучість, що ускладнює роботу з екстрактом та збільшує його витрати в процесі виробництва. Отриманий залишок темно-зелена в'язка маса з ароматним запахом.

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

30 Спосіб здійснюють за простою технологією, яку можливо відтворити на стандартному заводському обладнанні наступним чином. Заготовлену у фазі цвітіння подрібнену траву вероніки довголистої завантажують у циркуляційний екстрактор, заливають неполярним органічним розчинником та вичерпно екстрагують при постійно підтримуваній температурі 50-65 °C протягом 30-36 годин при загальному співвідношенні сировини до екстрагенту 1:10 з рециркуляцією екстрагенту у замкненому циклі до знебарвлення екстрагенту. Отриманий екстракт упарюють до видалення екстрагенту у вакуумі до отримання сухого залишку. Одержують субстанцію рослинного походження з вираженою антимікробною активністю щодо грам негативних мікроорганізмів та помірною щодо грампозитивних, нетоксичну, придатну до тривалого застосування без формування резистентності патогенних мікроорганізмів та побічних дій. 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 вероніки довголистої завантажили у циркуляційний екстрактор, заливали 10 л неполярного органічного розчинника та вичерпно екстрагували при постійно підтримуваній температурі 55 °C протягом 30 годин при загальному співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 з рециркуляцією екстрагента у замкненому циклі до знебарвлення екстрагенту. Отриманий екстракт упарювали до видалення екстрагенту у вакуумі до отримання сухого залишку.

Вихід цільового продукту становить 4,88 %.

45 Приклад 2. Антимікробну активність екстракту з трави вероніки довголистої, отриманого з заявленим способом, досліджували *in vitro* методом дифузії в агар (метод "колодязів"). 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 рефренс-штами мікроорганізмів, регламентовані ВООЗ для визначення антимікробної активності 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 $t=37$ °C. Термін культивування мікроорганізмів складав 24 години. Для кількісної оцінки антимікробної дії ліпофільного комплексу та визначення мінімальної пригнічуючої рiст мікроорганізмів концентрації використовували метод серійних розведень.

Досліджували антимікробну активність ліпофільного комплексу у вигляді 2 % розчину в 96° етанолі.

Таблиця 1

Специфічна активність ліпофільного комплексу трави
вероніки довголистої, одержаного за заявленим способом

Тест-штами мікроорганізмів	Діаметр зон затримки росту в мм	*МБсК, мкг/мл	**МБцК, мкг/мл
<i>S.aureus</i>	14,4±0,1	250	500
<i>E.coli</i>	27,2±0,2	62,5	125
<i>P.aeruginosa</i>	31,2±0,3	31,25	62,5
<i>B.subtilis</i>	14,6±0,3	250	500
<i>P.vulgaris</i>	24,5±0,2	125	250
<i>C.albicans</i>	12,0±0,1	250	500

Примітка:

*МБсК - мінімальна бактериостатична концентрація;

**МБцК - мінімальна бактерицидна концентрація.

Діаметри зон затримки росту складають 10-30 мм, що вказує на чутливість мікроорганізмів до екстракту. Аналіз даних таблиці 1 свідчить про те, що ліпофільний комплекс трави вероніки довголистої має виражену протимікробну дію до *E.coli*, *P.aeruginosa*, *P.vulgaris* та помірну антимікробну дію по відношенню до *S.aureus* та *B.subtilis*.

Даний спосіб отримання засобу антимікробної дії з трави вероніки довголистої відрізняється тим, що отриманий ліпофільний комплекс має високу антимікробну активність та проявляє мінімальні бактериостатичну та бактерицидну дію в дозі вдвічі нижчій. Тобто, ліпофільний комплекс трави вероніки довголистої має виражену антимікробну дію по відношенню до грам-негативних та помірну до грам-позитивних бактерій. Досліджуваний комплекс виявився мало активним по відношенню до *C.albicans*.

Отже, ліпофільний комплекс трави вероніки довголистої є новою високоефективною субстанцією рослинного походження з широким спектром антимікробної дії.

Заявлений спосіб одержання ліпофільного екстракту з трави вероніки довголистої з антимікробною активністю простий, економічний, передбачає використання доступної вітчизняної сировини, є екологічно безпечним і може бути здійснений на будь-якому фармацевтичному підприємстві зі стандартним обладнанням, має тривалий термін зберігання при одержанні спиртового розчину екстракту. Ліпофільний комплекс з трави вероніки довголистої, одержаний за заявленим способом, може бути використаний як лікарська субстанція при створенні антимікробних препаратів широкого спектра дії у різних лікарських формах.

Джерела інформації:

1. Пат. 29617, Україна, Заявл. 31.10.1995, опубл. 15.11.2000, Бюл. № 6, 2000 р.
2. Пат. 31032, Україна, Заявл. 02.07.1998, опубл. 16.12.2002, Бюл. № 12, 2002 р.
3. Пат. 64075, Україна, Заявл. 21.08.2002, опубл. 16.02.2004, Бюл. № 2, 2004 р.
4. Пат. 73209, Україна, Заявл. 19.05.2003, опубл. 15.06.2005, Бюл. № 6, 2005 р.
5. Пат. 67093, Україна, Заявл. 09.07.2003, опубл. 15.06.2004, Бюл. № 6, 2004 р.
6. Пат. 18309, Україна, Заявл. 27.03.2006, опубл. 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.
7. Пат. 56037, Україна, Заявл. 25.05.2010, опубл. 27.12.2010, Бюл. № 24, 2010 р.
8. Пат. 104173, Україна, Заявл. 31.10.2011, опубл. 10.01.2014, Бюл. № 1, 2014 р.
9. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: Метод, реком. / Волянський Ю.Л., Гриценко І.С., Ширококов В.П. і співавт. - Київ, - 2004. - 40 с.
10. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. / За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. - К.: Здоров'я, 2002. - С. 79-95, 292-306.
11. Методические рекомендации определения активности антибактериальных средств наружного применения для лечения гнойно-воспалительных инфекций: Метод. реком. / Калинин Н.Ф., Волянский Ю.Л., Старобинец З.Г. и соавторы / Харьков. - 1991. - 16 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання ліпофільного комплексу з антимікробною активністю включає багаторазову екстракцію рослинної сировини з рециркуляцією екстрагента у замкненому циклі, з використанням неполярного органічного розчинника, та з наступним упарюванням до

видалення екстрагенту і отримання сухого залишку, який **відрізняється** тим, що як сировину використовують траву вероніки довголистої (*Veronica longifolia* L.), екстракцію здійснюють до знебарвлення розчинника при постійно підтримуваній температурі 50-60 °С протягом 30-36 годин.

5

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