



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **146567** (13) **U**

(51) МПК (2021.01)

A61K 36/00

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2020 05762	(72) Винахідник(и): Михайленко Ольга Олександрівна (UA), Вільма Петрікайте (LT), Людас Иванаускас (LT), Ковальов Володимир Миколайович (UA), Георгіянц Вікторія Акопівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 07.09.2020	
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 04.03.2021	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 03.03.2021, Бюл.№ 9	(73) Володілець (володільці): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗАСОБУ З ПРОТИРАКОВОЮ, АНТИОКСИДАНТНОЮ ТА АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ З ЛИСТЯ КРОКУСУ ПОСІВНОГО

(57) Реферат:

Заявлений спосіб одержання засобу з протираковою, антиоксидантною та антибактеріальною активністю шляхом екстракції рослинної сировини з подальшою фільтрацією та упарюванням. Як рослинна сировина використовується листя крокусу посівного, а як екстрагент - дистильована вода, при загальному співвідношенні сировини до екстрагенту 1:20, спосіб здійснюють трикратною екстракцією при постійно підтримуваній температурі 80-90 °С.

UA 146567 U

UA 146567 U

Корисна модель належить до фармацевтичної та медичної галузі, зокрема до одержання комплексного засобу рослинного походження з протираковою, антиоксидантною та антибактеріальною активністю, що надалі може бути використано як активний компонент у різних лікарських формах для лікування та профілактики онкологічних захворювань.

У теперішній час велике значення приділяється пошуку рослин з протираковою активністю, що містять біологічно активні речовини (БАР) рослинного походження [1]. Вивчення багатовікового досвіду народної медицини є перспективним шляхом виявлення додаткових видів лікарської рослинної сировини (ЛРС), які після відповідних фармакологічних і клінічних досліджень в подальшому могли б використовуватися у науковій медицині. Після аналізу культивуваної рослинної бази України ми визначили за перспективне вивчення представників роду *Crocus* L. [2]. Перспективною рослиною, що має потенційну протиракову дію [3, 4] є крокус посівний (*Crocus sativus* L.), приймочки якої застосовують в медицині різних країн світу як протираковий, протизапальний, протисудомний, гіпотензивний засіб [5, 6]. Але первинним є застосуванням приймочок шафрану у харчовій промисловості [7]. Слід звернути увагу, що при виготовленні 1 кг спеції приймочок крокусу більше 1500 кг його листя є відходами виробництва та викидаються [6]. Відповідно до даних літератури, листя крокусу посівного містить різні класи БАР, а саме флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, дубильні речовини, полісахариди, які обумовлюють наявність різних фармакологічних дій у сировині [8, 9].

У літературі описані способи одержання препаратів антиоксидантної [10, 11], протизапальної, антибактеріальної дії з рослинної сировини крокусу посівного, які включають попереднє подрібнення сировини, екстракцію його концентрованим етиловим спиртом [10, 11], метанолом [12] або органічними розчинниками і подальшу очистку цільового продукту шляхом упарювання спиртової витяжки та екстракції водних залишків рідини або використання методу колонкової розподільної хроматографії. Недоліки методів полягають в багатостадійній технології процесів, використанні дорогих та отруйних екстрагентів - етанолу, метанолу та тривалість пробопідготовки.

Заявлений спосіб [10] одержання екстрактів з листя крокусу з антиоксидантною дією методом мацерації при кімнатній температурі впродовж 24 годин, має недоліком можливий розвиток контамінації шкідливих мікроорганізмів у екстракті і порівняно низький вихід субстанції (близько 4 %), та, крім того, проявив помірну антиоксидантну активність.

Метанольний екстракт листя [12] крокусу виявляв порівняно більшу антиоксидантну активність при інгібуванні 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу (DPPH) та, крім того проявив антимікробну активність відносно *Listeria* spp. Але недоліком наведених методів є застосування токсичного метанолу для екстракції. Наведено інший спосіб одержання екстракту з листя крокусу, що включав екстрагування сировини 70 % етанолом протягом 48 год. в темряві [13]. Отриманий екстракт листя крокусу проявляв антипроліферативний ефект на клітинах аденокарциноми (Caco-2) товстої кишки людини.

Дані літератури показали, що не було проведено спроб одержання екстрактів з листя крокусу екологічно прийнятним розчинником - дистильованою водою та відсутні інші експерименти встановлення фармакологічної активності.

Задачею корисної моделі є одержання засобу з протираковою, антиоксидантною та антибактеріальною дією з використанням нового способу екстракції листя крокусу посівного в заданих умовах, в результаті чого одержують новий ефективний комплексний рослинний засіб для застосування у лікуванні та профілактиці онкологічних захворювань.

Поставлена задача вирішується таким чином, що спосіб одержання нового засобу з протираковими, антиоксидантними та антибактеріальними властивостями включає в себе трикратну екстракцію рослинної сировини дистильованою водою при температурі 80-90 °C з подальшою фільтрацією, об'єднанням екстрактів та концентрацією у вакуумі до сухого залишку. Згідно з корисною моделлю, як рослинна сировина використовуються листя крокусу посівного, що залишилися після вилучення примочок шафрану. Екстракція здійснюється у три етапи: перша екстракція відбувається, при співвідношенні сировини та екстрагенту 1:20 впродовж 2 годин, друга та третя - 1:5 впродовж 1 години відповідно.

Як рослинну сировину для заявленого способу авторами було вибрано листя крокусу посівного (*Crocus sativus*), родини півникові (Iridaceae). З квітів *C. sativus* вилучають примочки, висушують їх та використовують як приправу. При отриманні 1 кг спеції із шафранових стигм, більше 1500 кг листя в даний час вважаються відходами виробництва. Але завдяки біологічно активним сполукам (флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, терпеноїди, карбонові кислоти, амінокислоти та інші) потенційно можуть бути використані як функціональні компоненти харчових продуктів та дієтичні добавки.

Всі параметри заявленого способу встановлені експериментально, враховуючи біологічну активність засобу, його ефективність, доступність та безпечність реактивів, а також практичність відтворення наведеного способу у промислових умовах.

Вибір оптимального екстрагента було здійснено експериментальним шляхом, враховуючи кількість одержаних екстрактивних речовин, а також вартість та безпечність екстрагента. Такий екстрагент є доступним та екологічно безпечним.

Сумарне співвідношення сировини та екстрагента складає 1:20, що було встановлено експериментальним шляхом та є оптимальним для даного виду сировини. При зменшенні об'єму екстрагента процес екстракції погіршується. Збільшення екстрагента понад задане співвідношення економічно недоцільне.

Загальний час екстракції становить 4 години, що є достатнім для максимального вилучення біологічно активних речовин з протираковою, антиоксидантною та антибактеріальною дією.

Заявлений спосіб здійснюють трикотною екстракцією повітряно-сухого листа крокусу посівного дистильованою водою з загальним часом екстракції 4 години. Для першої екстракції використовують співвідношення сировини та екстрагента 1:20 та екстрагують протягом 2 годин при температурі 90 °C. Другу та третю екстракцію здійснюють при співвідношенні сировина:екстрагент 1:5 впродовж 1 години кожна. Одержані екстракти об'єднують, фільтрують та концентрують у вакуумі до одержання сухого порошку фіолетово-коричневого кольору з характерним запахом. Вихід сухого екстракту становить 25,6 % від повітряно-сухої сировини. Корисна модель пояснюється прикладами.

Приклад 1. 1,0 кг повітряно-сухого подрібненого до часток 2-3 мм листа крокусу посівного заливали 10,0 л дистильованої води та екстрагували при періодичному перемішуванні підтримуючи температуру водяної бані 90 °C протягом 2,0 годин. Процес повторювали двічі, додаючи екстрагент по 5,0 л та нагріваючи протягом 1 години. Одержані екстракти фільтрували, об'єднували та упарювали у вакуум-циркуляційному апараті при температурі 85-90 °C до отримання сухого продукту. Вихід сухого екстракту склав 25,6 %.

Приклад 2. Дослідження протиракової активності сухого водного екстракту з листа крокусу посівного проводили *in vitro* на лініях ракових клітин меланоми людини IGR39 і людської лінії потрійного негативного раку молочної залози MDA-MB-231, на базі Литовського університету наук про здоров'я (Каунас, Республіка Литва).

Досліджуваний екстракт, приготовлений з листа крокусу був більш активним відносно раку молочної залози, ніж клітинна лінія меланоми шкіри (фіг. 1).

На фіг. 1 зображена протиракова активність водного екстракту листа крокусу посівного.

Приклад 3. Вивчення антимікробної активності сухого водного екстракту з листа крокусу посівного проводили методом дифузії в агар та методом серійних розведень в Інституті мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова в лабораторії біохімії мікроорганізмів та живильних середовищ під керівництвом к.б.н. Осолодченко Т.П.

Відповідно до рекомендацій ВООЗ для оцінки активності препаратів використовували референс-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* NCTC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Basillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* 885/653 ATCC. Для аналізу використовували 1 % водний розчин сухого екстракту з листа крокусу посівного. Були визначені бактеріостатичні концентрації - МПК (мінімально-пригнічуючої концентрації) екстракту. Досліджений зразок виявляє антимікробну дію відносно різних таксономічних груп мікроорганізмів (табл. 1).

Таблиця 1

Дослідження антибактеріальної активності екстракту
з листа крокусу посівного відносно тест-штамів мікроорганізмів

Штами мікроорганізмів	Зона затримки росту мікроорганізму, мм	МПК, мкг/мл екстракту
<i>S. aureus</i> 25923 ATCC	16,55±0,01	125
<i>E. coli</i> 25922 ATCC	16,00±0,05	250
<i>P. vulgaris</i> 4636 NCTC	16,50±0,12	500
<i>P. aeruginosa</i> 27853 ATCC	15,40±0,05	500
<i>B. subtilis</i> 6633 ATCC	18,00±0,03	125
<i>C. albicans</i> 885/653 ATCC	15,20±0,05	250

Крім того, проводили дослідження дії екстракту відносно клінічних штамів мікроорганізмів, дані представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

Дослідження антибактеріальної активності екстракту з листя крокусу посівного методом дифузії в агар відносно клінічних штамів мікроорганізмів

Штами мікроорганізмів	Зона затримки росту мікроорганізму, мм	МПК, мкг/мл екстракту
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,50±0,05	250
<i>Escherichia coli</i>	зріст	500
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	зріст	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	зріст	500
<i>Enterobacter cloacea</i>	14,0±0,02	500
<i>Candida albicans</i>	14,30±0,20	250

5 Аналіз даних таблиць 1 та 2 свідчить, що екстракт з листя крокусу посівного, одержаного за заявленим способом, проявляє антимікробну активність відносно усіх тест-штамів мікроорганізмів.

10 Приклад. 4. Дослідження антирадикальної (антиоксидантної) активності сухого екстракту листя крокусу проводили методом пост-колонкової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) при 293 нм / 650 нм із використанням ABTS-тесту (2,2'-азинобіс(3-етилбензтіазоліно)-6-сульфонова кислота). Як препарат порівняння використано Тролокс у діапазоні розведення 0.625-80 мг/мл.

15 У екстракті листя ідентифіковано дев'ять фенольних сполук разом з чотирма невідомими сполуками, які обумовлюють виявлену антирадикальну активність. Антиоксидантну активність ідентифікованих і неідентифікованих сполук виражали у вигляді ТЕ АС (Trolox ммоль/л) і представлені у Таблиці 3.

Таблиця 3

Дослідження активності поглинання радикалів окремих сполук, виражених як ТЕАС (ммоль/л) у екстракті з листя крокусу посівного з використанням післяколонкового аналізу ABTS методом ВЕРХ

	Назва сполуки	Час утримання	Площа	ABTS тест, ммоль/л
1	Ванілінова кислота	13,058	481617	0,030
2	Кавова кислота	14,283	2470017	0,154
3	Мангіферин	15,313	6472621	0,405
4	Не ідентифіковано	17,180	878909	0,055
5	Ізоорієнтин	18,693	428077	0,0026
6	Кумарова кислота	20,754	2472979	0,154
7	Рутин	22,398	3581621	0,224
8	Ферулова кислота	23,691	2906745	0,182
9	Ізокверцетин	26,560	567078	0,036
10	Текторидин	29,759	51631	0,003
11	Апігенін-7-глюкозид	30,679	64537	0,004
12	Саліцилова кислота	38,429	302212	0,019
13	Кверцетин	40,708	139348	0,009
14	Кемпферол	59,193	1977522	0,124

20 Антиоксидантна активність екстракту листя крокусу становила 1,27 ммоль/л у перерахунку на тролоксом 0,3995 ммоль/л, що свідчить про виражену дію.

Також антиоксидантну активність сухого екстракту, одержаного заявленим способом, вивчали електрохімічним методом потенціометричним, з використанням медіаторної системи $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ на базі НТУ "ХПІ" (м. Харків) під керівництвом Домарева А.П. Препаратом порівняння був розчин стандарту галової кислоти. Антиоксидантна активність

сухого екстракту склала 6,0 мг/г у перерахунку на галову кислоту, що свідчить про помірну антиоксидантну активність.

Таким чином заявлено новий спосіб одержання комплексного засобу з протираковою, антиоксидантною та антибактеріальною активністю, який відзначається рядом переваг:

5 1) простота виконання та можливість здійснення на стандартному обладнанні в промислових умовах України;

2) використання як екстрагента дистильованої води, що зумовлює доступність та безпечність на всіх етапах роботи;

10 3) використання як сировини листя крокусу посівного, що залишається після заготовки примочок шафрану та є відходами виробництва. Це дає можливість заготовляти їх впродовж всього вегетаційного періоду;

4) наявність вираженої протиракової, антиоксидантної та антибактеріальної активності екстракту з листя крокусу посівного, одержаного заявленим способом;

15 5) перспективність використання одержаного екстракту як лікарської субстанції для одержання різних лікарських форм;

6) відсутність токсичності екстракту, одержаного заявленим способом, дозволяє використовувати його в лімітованих групах споживачів та впродовж тривалого терміну лікування;

7) тривалий термін зберігання засобу, одержаного заявленим способом.

20 Джерела інформації:

1. Wang X., Chen Y., Fang Z. In-vitro photothermal therapy using plant extract polyphenols functionalized graphene sheets for treatment of lung cancer / X. Wang, Y. Chen, Z. Fang // Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology.-2020. - Vol. 204. - P. 111587-111593.

25 2. Михайленко О.О. Дослідження біологічно активних речовин приймочок крокусу посівного (шафран) з України / О.О. Михайленко // Фармацевтичний журнал.-2019. - Т. 74, вып 6. - С. 70-77.

3. Samarghandian S., Borji A. Anticarcinogenic effect of saffron {Crocus sativus L.} and its ingredients / S. Samarghandian, A. Borji // Pharmacognosy Research.-2014. - Vol. 6. - P. 99-107.

30 4. Alireza M., Kurosh D., Banafshe H. The toxicity of saffron {Crocus sativus L.} and its constituents against normal and cancer cells / M. Alireza, D. Kurosh, H. Banafshe // Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism.-2016. - Vol. 3. -P. 23-32.

5. Gohari A.R., Saeidnia S., Mahmoodabadi M.K. An overview on saffron, phytochemicals, and medicinal properties / A.R. Gohari, S. Saeidnia, M.K. Mahmoodabadi // Pharmacognosy Review.-2013. - Vol. 7. - P. 61-66.

35 6. Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus Crocus: A review / O. Mykhailenko, V. Kovalyov, O. Goryacha, L. Ivanauskas, V. Georgiyants // Phytochemistry.-2019. - Vol. 162. - P. 56-89.

7. Saffron, a functional spice / A. Kyriakoudi, S.A. Ordoudi, M. Roldan-Medina, M.Z. Tsimidou // Austin journal of nutrition and food sciences.-2015. - Vol. 3.-P. 1059-1064.

40 8. Santana-Meridas O., Gonzalez-Coloma A., Sanchez-Vioque R. Agricultural residues as a source of bioactive natural products / O. Santana-Meridas, A. Gonzalez-Coloma, R. Sanchez-Vioque // Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe.-2012. - Vol. 11. - P. 447-466.

45 9. Valorization of saffron industry by-products: Bioactive compounds from leaves / L. Smolskaite, T. Talou, N. Fabre, P.R. Venskutonis // Proceedings of the 6th Baltic Conference on Food Science and Technology FOODBALT-2011, (Jelgava, Latvia, May 5-6). In E. Straumite (Ed.), Innovations for food science and production. Riga, Latvia: Faculty of Food Technology.-2011. -P. 67-72.

50 10. Determination of antioxidant properties of six by-products of Crocus sativus L. (saffron) plant products / I. Lahmass, S. Ouahhoud, M. Elmansuri, A. Sabouni, M. Elyoubi, R. Benabbas, M. Choukri, E. Saalaoui // Waste and Biomass Valorization.-2018. - Vol. 9. - P. 1349-1357.

11. Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of Crocus sativus and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast / S.A. Baba, A.H. Malik, Z.A. Wani, T. Mohiuddin, Z. Shah, N. Abbas, N. Ashraf// South African Journal of Botany.-2015. -Vol. 99.-P. 80-87.

55 12. Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of Moroccan Crocus sativus L. petals and leaves / S.M. Jadouali, H. Atifi, Z. Bouzoubaa, K. Majourhat, S. Gharby, F. Achemchem, A. Elmoslih, A. Laknifli, R. Mamouni // Journal of material environmental sciences.-2018. - Vol. 9. - P. 113-118.

60 13. Polyphenol composition and in vitro antiproliferative effect of corm, tepal and leaf from Crocus sativus L. on human colon adenocarcinoma cells (Caco-2) / R. Sanchez-Vioque, O. Santana-Meridas,

M. Polissiou, J. Vioque, K. Astraka, M. Alaizd, D. Herraiz-Penalvera, P.A. Tarantilis, J. Giron-Calle // Journal of functional foods.-2016. - Vol. 24. - P. 18-25.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Спосіб одержання засобу з протираковою, антиоксидантною та антибактеріальною активністю шляхом екстракції рослинної сировини з подальшою фільтрацією та упарюванням, який **відрізняється** тим, що як рослинна сировина використовується листя крокусу посівного, а як екстрагент - дистильована вода, при загальному співвідношенні сировини до екстрагенту 1:20, спосіб здійснюють трикратною екстракцією при постійно підтримуваній температурі 80-90 °С.

10

