



STIMULY PRE VÝSKUM A VÝVOJ

**Medicproduct, a.s. Lipany
Prešovská univerzita v Prešove**

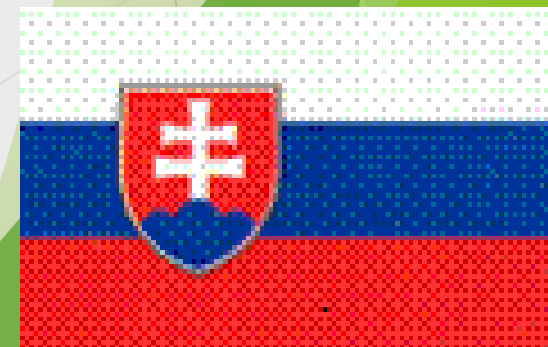


Izolácia prírodných látok rastlín procesom lyofilizácie a zmeny ich kvalitatívno- kvantitatívnych vlastností



Vedúci projektu: PharmDr. Ján Tomasch

doc. RNDr. Ivan Šalamon, CSc.



IDENTIFIKÁCIA PROJEKTU

Evidenčné číslo projektu: 00162-0001 (MŠ SR-3634/2010-11)

Projekt základného výskumu (stimuly pre výskum a vývoj)

Názov projektu:

„Izolácia prírodných látok rastlín procesom lyofilizácie a zmeny ich kvalitatívno - kvantitatívnych vlastností“

- rozšírenie existujúceho pracoviska výskumu a vývoja

Doba riešenia projektu: 1. 6. 2010 - 31. 12. 2012

Počet novovytvorených pracovných miest v rámci celého obdobia riešenia projektu základného výskumu: 4

IDENTIFIKÁCIA RIEŠITEĽSKEJ ORGANIZÁCIE

Identifikácia riešiteľa: **MEDICPRODUCT, a.s.**



ul. kpt. Nálepku 2, 082 71 Lipany

Prešovský samosprávny kraj

IČO: 31630081

DIČ: SK2020525023

Kontaktná osoba: RNDr. Pavol Labun, PhD.

labun@medicproduct.sk

Identifikácia spoluriešiteľa: **Prešovská univerzita v Prešove**

ul. 17. Novembra 15, 080 01 Prešov

Kontaktná osoba: doc. RNDr. Ivan Šalamon, CSc.



OBSAHOVÁ NÁPLŇ PROJEKTU

V udržiavaní zdravia našej populácie majú nezastupiteľné miesto a svoj dôležitý význam prírodné látky, izolované z rastlinných zdrojov a priemyselný výskum v rámci možností výroby nových lyofilizátov pomocou dehydrogenácie ich extraktov.

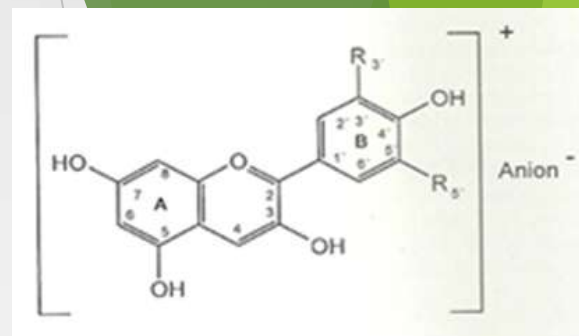
HLAVNÝ CIEĽ PROJEKTU

- ▶ Cieľom projektu základného výskumu je štúdium izolácie prírodných látok z rôznych druhov rastlinných zdrojov pomocou vymrazovacieho sušenia s nastavovaním rôznych parametrov, ich determinácia pred separáciou a po nej.
- ▶ Konkrétne sa porovnávajú ich kvalitatívno-kvantitatívne charakteristiky (množstvá a jednotlivý výskyt v použitej rastlinnej droge a vo výslednom lyofilizáte).
- ▶ Následne sa urobia biologické a antimikrobiálne testy na účinnosť, toxicitu na živé systémy buniek (cytogenetické metódy, genotoxicita, detegovanie apoptózy a viabilita s použitím metabolických markerov).



- ▶ Realizácia výskumných prác potvrdila, že metódou lyofilizácie sa dajú izolovať prírodné látky (antokyány) z rastlinného materiálu.
- ▶ Antokyány patria do skupiny rastlinných pigmentov a vyznačujú sa širokým spektrom biologických účinkov:

- spomalenie oxidačnej degradácie lipidov, preventívna úloha vo vývoji rakoviny a srdcových chorôb, zvyšujú funkciu redukčných činidiel a podporujú inhibíciu LDL cholesterolu,
- chránia lipidovú membránu proti oxidácii škodlivými substanciami, zvyšujú antimutagénny účinnosti, urýchľujú hojenia rán, napomáhajú pri odbúravaní tukov u pacientov s ischemickou srdcovou chorobou, zlepšujú regeneráciu očnej sietnice a podporujú adaptáciu oka na šero po oslnení.



Štruktúra molekuly antokyánu

Zodpovední riešitelia projektu za Medicproduct, a.s.:

- rok 2010 - 2011: MVDr. Pavel Ragáč, CSc.
- rok 2012: PharmDr. Ján Tomasch

Zodpovední riešiteľ projektu za Prešovskú univerzitu v Prešove:

- rok 2010 - 2012: doc. RNDr. Ivan Šalamon, CSc.



Plnenie extraktu na plniacej linke do lyofilizačných fľaštičiek

POPIS ČIASTKOVÝCH CIEĽOV PODĽA ETÁP

► I. výber rastlinného materiálu a identifikácia jeho prírodných látok (01.06.2010 - 01.06.2011)

Rastliny (liečivé) pochádzajú zo širokého spektra druhov so značnou biodiverzitou ich prírodných látok a ich chemotypov. Stručný metodický postup riešenia a špecifikácia metód použitých v súvislosti s konkrétnym návrhom dosiahnutia cieľov projektu je sústredená na:

- aplikácii kvalitatívnych metód produkčnej a populačnej ekológie pre hodnotenie aspektov rastu vybraných rastlinných druhov,
- stanovení kvalitatívno-kvantitatívnych parametrov liečebne aktívnych sekundárnych metabolitov pomocou GC/MS, LC/MS/IT/TOF,
- determinácia rizík a toxicity životného prostredia AAS analýza (ťažké kovy),
- gamaspektrofotometrická analýza (rádioaktivita), GC analýza reziduí použitých pesticídov a -mikrobiologické testy použitých rastlinných drog.



Školský pozemok PU v Prešove



Výskumné lokality v Levočských vrchoch.

► **II. vodná extrakcia prírodných látok a ich vymrazovacie sušenie (01.01.2011 - 01.06.2012)**

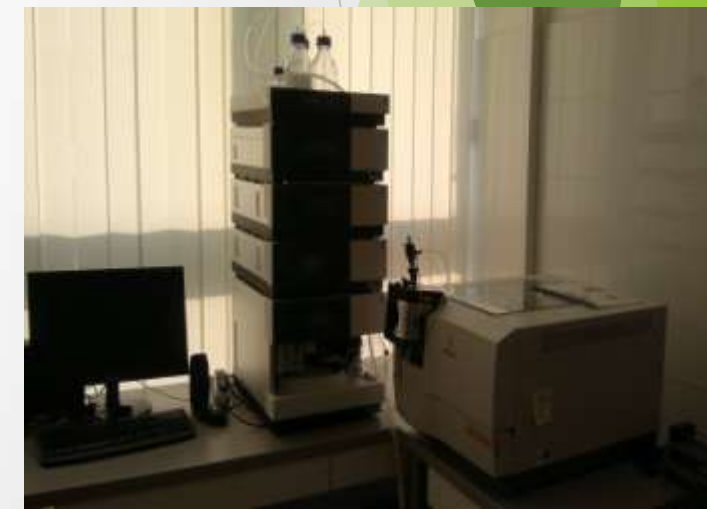
- vodná extrakcia z dopestovanej rastlinnej suroviny s vyššími parametrami štandardizácie na obsahy liečebne účinných látok,
- introdukcia dehydratačných metód pre rôzne extrakty pri rôznych parametroch,
- stanovenie kvalitatívno-kvantitatívnych parametrov sekundárnych metabolitov pomocou GC/MS, LC/MS/IT/TOF v lyofilizátoch.



Laboratórium pre extrakciu a destiláciu sekundárnych metabolitov rastlín



GC/MS pre determináciu prírodných látok



LC/MS pre determináciu prírodných látok

► **III. lyofilizáty ich biologické a mikrobiálne vlastnosti (01.01.2012 - 31.12.2012)**

- testovanie antioxidantných vlastností (aktivita extraktov a lyofilizátov na vychytávanie radikálov),
- *in vitro* metódy biologického testovania vyrobených extraktov a lyofilizátov:
 - a) cytogenetické metódy,
 - b) genotoxicita resp. DNA poškodenie na úrovni chromozómov,
 - c) detegovanie apoptózy,
 - d) stanovenie bunkovej proliferácie,
 - e) viabilita s použitím metabolických markerov.



Svetelný mikroskop s kamerovým snímaním obrazu



Kryoskop na zistenie kryštalizačnej teploty extraktu antokyánov



Výstavba nového mikrobiologického a imunologického laboratória

REKAPITULÁCIA ZAČATIA PROJEKTU

Schválenie poskytnutia stimulov bolo 9. 6. 2010 „**Rozhodnutím**“ Ministerstva školstva SR v celkovej výške 1 999 840,0 € a úľavy na dani z príjmu vo výške 0 €.

Dotácia bola rozdelená na tri etapy:

v r. 2010 v sume 1 306 348,0 €

v r. 2011 v sume 348 896,0 €

v r. 2012 v sume 344 596,0 €

Počet novovytvorených pracovných miest v rámci celého obdobia riešenia projektu základného výskumu: 4



Skúmané rastlinné druhy: vinič hroznorodý, brusnica čučoriedková, čučoriedka chocholíkatá a baza čierna

ZHRNUTIE REALIZÁCIE PROJEKTU ZA ROK 2010

Splnenie podmienok v zmysle zákona č. 185/2009 Z.z.
o stimuloch pre výskum a vývoj:

- rozšírenie pracoviska výskumu a vývoja, začlenenie do organizačnej štruktúry spoločnosti Medicproduct, a.s.
- štatút úseku výskumu a vývoja - vrátane popisu činnosti novozriadených útvarov
- zdokumentovanie zmluvy so spoluriešiteľskou organizáciou Prešovskou univerzitou v Prešove
- spoločnosť z vlastných finančných prostriedkov na 3. nadzemnom podlaží výrobo-prevádzkovej budovy firmy zriadila laboratóriá pre výskum a vývoj, vrátane čistých priestorov, vzduchotechniky a klimatizácie, spĺňajúce kritériá GMP, vo výške 423 000.- €

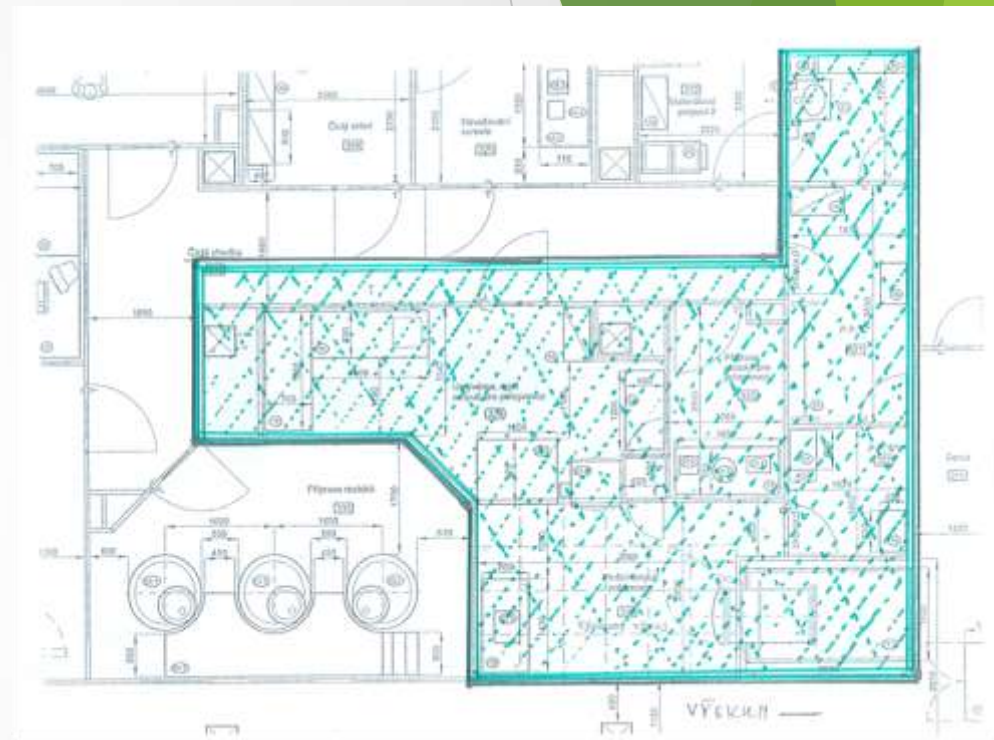


Schéma vybudovaných priestorov úseku výskumu
a vývoja v Lipanoch

VECNÉ ZHODNOTENIE PROJEKTU ZA ROK 2010

Uskutočnil sa výber rastlinného materiálu a lokalít - zdrojov plodov vybraných druhov rastlín a zhodnotenie faktorov prostredia vplývajúcich na úrodu plodov, obsah a zloženie antokyánov:

- ▶ čučoriedka obyčajná (brusnica čučoriedková) (*Vaccinium myrtillus* L.)
- ▶ brusnica (čučoriedka) chocholíkatá (vysoká) (*Vaccinium corymbosum* L.)
- ▶ baza čierna (*Sambucus nigra* L.)
- ▶ vinič hroznorodý (*Vitis vinifera* L.)
- ▶ jarabina čiernoplodá (arónia) (*Aronia melanocarpa* Wild.)

Uskutočnila sa špecifikácia zariadení, prístrojov a iných pomôcok v rámci vybudovania technickej infraštruktúry pre potreby základného výskumu:

- ▶ lyofilizačné zariadenie,
- ▶ analytické zariadenie LC MS IT TOF (detekcia QIT kvadrupólová iónová pasca v spojení TOF - orthogonal acceleration time of flight)
- ▶ FTIR spektrofotometer

FINANČNÉ ZHODNOTENIE PROJEKTU ZA ROK 2010

- ▶ V roku 2010 bolo na účely riešenia pridelených celkovo 1 306 348.- €, z tejto čiastky na bežné výdavky 89 848.- € a na kapitálové výdavky 1 216 500.- €.

Pre Medicproduct, a.s.:

- 89 848.- € na bežné výdavky
- 1 216 500.- € na kapitálové výdavky

Pre Prešovskú univerzitu v Prešove:

- 59 040.- € na bežné výdavky
- 85 500.- € na kapitálové výdavky

ZHRNUTIE REALIZÁCIE PROJEKTU ZA ROK 2011

► 1. Etapa - výber rastlinného materiálu a identifikácia prírodných látok

Uskutočnil sa zber plodov vybraných druhov rastlinných druhov z vybraných lokalít.

Uskutočnila sa príprava analytických laboratórií, vybavenie laboratórií, výber analytických metód, postupov, HPLC kolón, výber a zakúpenie štandardov, optimalizácia analytických postupov a uskutočnenie meraní vzoriek

► 2. Etapa - Vodná extrakcia prírodných látok a ich vymrazovacie sušenie

Uskutočnil sa vývoj extrakčných procesov s dôrazom na zvýšenie výťažnosti obsahu antokyánov pomocou rôznych extrakčných techník, (voda-etanol, voda acetón, s rôznymi pomermi kyselín (mravčia, citrónová, chlorovodíková), pripravili sa vodné a vodnoalkoholické extrakty z vybraných druhov materiálov,

- zrealizovali sa analýzy antokyánov v extraktoch spektrálne (metódou UV-VIS) a pomocou zariadenia LC/MS (kvapalinový chromatograf s hmotnostným detektorom),
- získané extrakty boli podrobené kryoskopickému analýze kryštalizačnej teploty, sublimačnej teploty, teploty a tlaku primárneho a sekundárneho sušenia,
- v extraktoch sa vykonali merania antokyánov metódami LC/MS a LC/MS IT-TOF.

FINANČNÉ ZHODNOTENIE PROJEKTU ZA ROK 2011

- ▶ V roku 2011 bolo na účely riešenia pridelených celkovo 348 896.- €, z toho 3000.- € činili kapitálové výdavky pre spoluriešiteľa. Z roku 2010 ostali na účtoch prijímateľa a spoluriešiteľa kapitálové finančné prostriedky vo výške 1 216 500.- €.

Pre Medicproduct a.s.:

- 238 860.- € na bežné výdavky
- 1 131 000.- € na kapitálové výdavky

Pre Prešovskú univerzitu v Prešove:

- 107 080.- € na bežné výdavky
- 88 500.- € na kapitálové výdavky

V tomto roku bolo v rámci prezentácie projektu a vykonaných prác vydaných 7 publikácií v zahraničných časopisoch a zborníkoch z konferencií.



Proces pertľovania produktu lyofilizácie

ZHRNUTIE REALIZÁCIE PROJEKTU ZA ROK 2012

2.Etapa - Vodná extrakcia prírodných látok a ich vymrazovacie sušenie

SUBETAPY:

2.1 vodná extrakcia z dopestovanej rastlinnej suroviny s vyššími parametrami štandardizácie na obsahy liečebne účinných látok

2.2 introdukcia dehydratačných metód pre rôzne extrakty pomocou lyofilizácie pri rôznych parametroch

2.3 stanovenie kvalitatívno-kvantitatívnych parametrov sekundárnych metabolitov pomocou LC/MS, LC/MS/IT/TOF v lyofilizátoch

3.Etapa - Lyofilizáty a ich biologické a mikrobiálne vlastnosti

SUBETAPY:

3.1 testovanie antioxidačných vlastností

3.2 in vitro metódy biologického testovania vyrobených extraktov

3.3 vypracovanie všeobecných kvalitatívno-kvantitatívnych charakteristík jednotlivých lyofilizátov z rôznych druhov rastlín

FINANČNÉ ZHODNOTENIE PROJEKTU ZA ROK 2012

- ▶ V roku 2012 sme dostali na účely riešenia celkovo 344 596.- €, z toho na bežné náklady 344 596.- €. Z roku 2011 ostali na účtoch prijímateľa a spoluriešiteľa stimulov kapitálové finančné prostriedky v sume 393 554,36 €.

Pre Medicproduct, a.s.:

- 238 816.- € na bežné výdavky
- 213.- € na kapitálové výdavky

Pre Prešovskú univerzitu v Prešove:

- 105 780.- € na bežné výdavky
- 1 341,36.- € na kapitálové výdavky

REALIZAČNÉ VÝSTUPY ZA ROK 2012

	Plánované	Zrealizované
V2- nové poznatky orientované na špecifický cieľ alebo úlohu z praxe rozvinuté do následne aplikovateľnej prípadne funkčnej podoby	1	1
V3 - vytvorenie nových materiálov, výrobkov a zariadení alebo podstatné zdokonalenie (inovácia) tých, ktoré sa už používajú	3	3
V4 – vytvorenie nových procesov, technologických postupov, systémov a služieb (vrátane software) alebo podstatné zdokonalenie (inovácia) tých, ktoré sa už používajú	1	1

PUBLIKAČNÉ VÝSTUPY

Počet výstupov	Kód a názov	2012	
		Plánované	Zrealizované
1. Publikácie	AAB, ADC, ADE, ADF, AFC, AED, AFE, BCI	16	16
5. Aplikované výsledky		3	3

ZÁVER

- ▶ Riešenie projektu pre akciovú spoločnosť jednoznačne prinieslo skvalitnenie jej infraštruktúry, rozšírenie činnosti o nové aktivity, zlepšenie podmienok pre výskum a vývoj firmy o nové tvorivé nápady flexibilne reagujúce na oveľa vyššiu konkurencieschopnosť v rámci národného a medzinárodného výskumu.
- ▶ Zároveň sa otvorili nové možnosti pre spoluprácu s organizáciami z hospodársko-spoločenskej praxe a najmä s vedecko-výskumnými inštitúciami.
- ▶ Dovybavenia laboratória o špičkovú analytickú techniku dotvorili výskumno-výrobné prostredie na úrovni poloprevádzky, ktoré zabezpečilo získanie komplexných informácií pre celý proces vývoja a využitia biologicky aktívnych látok.
- ▶ V širšom poňatí to bude mať jednoznačný význam a preukázateľný dopad na rozvoj regiónu v oblastiach pri podpore špeciálnej farmaceutickej výroby, spracovania prírodných produktov a zabezpečenie trvalo udržateľného rozvoja vidieka.

- ▶ **Patenty - prijaté prihlášky patentu, udelené patenty vychádzajúce alebo pripravované z výsledkov riešenia projektu**

Kód 1 - Zverejnená patentová prihláška v SR

Dátum zverejnenia: 02.07.2014

Číslo dokumentu: 104-2012

Vestník ÚPV SR č.: 07/2014

Prihlasovateľ.: MEDICPRODUCT, a.s., Lipany, SK

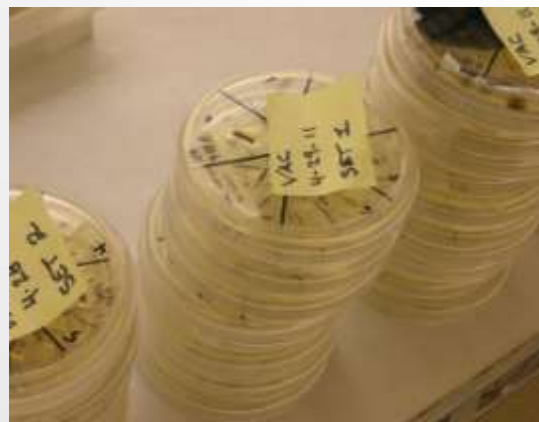
Názov: Spôsob lyofilizácie antokyánov z extraktov drobných plodov liečivých rastlín

Anotácia: Opísaný je spôsob lyofilizácie antokyánov z extraktov drobných plodov liečivých rastlín, ktorý spočíva v extrakcii čerstvých a/alebo zmrazených, a/alebo lyofilizovaných plodov etanolom alebo acetónom, purifikácii a odparení rezíduí rozpúšťadiel z extraktu a päťstupňového lyofilizačného programu.

► Aplikované výsledky

nové výrobky:

- lyofilizát extraktu z plodov arónie čiernoplodej,
- lyofilizát extraktu z plodov bazy čiernej,
- lyofilizát extraktu z plodov čučoriedky obyčajnej,
- lyofilizát extraktu z plodov ríbezle čiernej,
- lyofilizát extraktu z plodov viniča hroznorodého,



Pohľad na priebeh procesu prípravy lyofilizácie extraktu, ktorý je umiestnený vo vialkách a na uzavretú vialku po lyofilizácii

► Vytvorené partnerstva za roky 2010 - 2014

- Vytvorené partnerstvo medzi Prešovskou univerzitou, Centrom excelentnosti ekológie živočíchov a človeka PU a Medicproductom, a.s. Lipany, ktoré podporilo aktívnu spoluprácu pri absolvovaní stáží a študijných pobytov tvorivých pracovníkov vedy-výskumu a PhD. doktorandov pre prácu v laboratóriách súkromného sektora a priemyslu.
- Návrh pilotného projektu na manažmentu a koordinácii klastrovej spolupráce s producentmi, spoločnosťami a sprostredkovateľmi vytvorenia s dôrazom na regulačné nástroje a aktivity pre spracovanie suroviny, výrobu bioaktívnych potravín a ich distribúciu.
- Spolupráca medzi Prešovskou univerzitou, Centrom excelentnosti ekológie živočíchov a človeka PU, Katedrou ekológie a Medicproductom, a.s. Lipany pri riešení projektu OPV-2011/1.2/03-SORO *Akcelerácia rozvoja ľudských zdrojov vo vede a výskume, inovácia a zlepšenie kvality vzdelávacieho procesu* ITMS: 26110230069.
- Zriadilo sa spoločné pracovisko medzi PU v Prešove a Úsekom výskumu a vývoja firmy Medicproduct, a.s. Lipany. Aktuálne prebieha realizácia odborných praxí študentov, doktorandov a tvorivých pracovníkov s dôrazom na praktické zdokonaľovanie ich kompetentnosti, tvorivosti a spoluprácu v oblasti výskumu a izolácie prírodných látok.

► Inovačné tendencie projektu

V rámci konkrétnych inovačných aktivít je potrebné vyzdvihnúť:

- kvapalinovú chromatografiu v spojení s vysoko rozlišovacím hmotnostným analyzátorom (LC/MS/IT TOF), ktorú priradíme k inovácii procesu umožňujúceho:
 - identifikáciu neznámych látok,
 - kvantitatívne určenie ich obsahu v danej vzorke.
- vývoj nových produktov tzv. aditív potravín na báze prírodných látok,
- príprava vzoriek surovín, plodov jednotlivých rastlinných druhov a ich extraktov procesom lyofilizácie, ktorej používanie sa overuje pre zvýšenie stability a koncentrácie antokyánov v analyzovaných vzorkách,
- vybudovanie úseku výskumu a vývoja vo firme Medicproduct, a.s. v Lipanoch na rozšírenie základného výskumu v oblasti lyofilizácie prírodných látok.

HLAVNÝ SPOLOČENSKO-HOSPODÁRSKY PRÍNOS VÝSLEDKOV PROJEKTU

► Zabezpečenie optimálnej stratégie riadenia firmy

- **Charakteristika prínosu:** Pre prijímateľa stimulov bola vytvorená optimálna východisková pozícia pre získanie mladých kvalifikovaných pracovníkov s kompetentnosťou, odbornosťou, tvorivosťou a schopnosťou medzinárodnej spolupráce pre pozície manažérov a kvalifikovaných osôb pre procesy riadenia a kontroly.

► Zvyšovanie kompetenčného profilu mladých pracovníkov a doktorandov

- **Charakteristika prínosu:** Zahraničnými cestami a študijnými pobytmi sa vytvorili príležitosti pre mladých výskumných pracovníkov, doktorandov a študentov uskutočňovať výskum na experimentálnych zariadeniach, ktorými disponujú európske a svetové výskumné inštitúcie.
- Zahraničnými cestami a študijnými pobytmi sa vytvorili príležitosti pre mladých výskumných pracovníkov, doktorandov a študentov uskutočňovať výskum na experimentálnych zariadeniach, ktorými disponujú európske a svetové výskumné inštitúcie.

► Inovácia metód a postupov

- **Charakteristika prínosu:** Prostredníctvom riešenia projektu boli zabezpečené: FTIR spektrofotometer firmy Shimadzu, analytické váhy, automatický titrátor, umývačka skla a odporovacie zariadenie.
- Prostredníctvom riešenia projektu boli zabezpečené moderné analytické zariadenia, ktoré umožňujú napredovaniu výskumných aktivít a zefektívneniu fungovania výskumno-vývojového oddelenia.

- Vytvorené partnerstvo medzi Prešovskou univerzitou, Centrom excelentnosti ekológie živočíchov a človeka PU a Medicproductom, a.s. Lipany, ktoré podporilo aktívnu spoluprácu pri absolvovaní stáží a študijných pobytov tvorivých pracovníkov vedy-výskumu a PhD. doktorandov pre prácu v laboratóriách súkromného sektora a priemyslu.
- v roku 2013, podanie projektu v rámci inovácií na MH SR s názvom: „*Kryoskopické stanovenie základných parametrov a lyofilizácie prírodných látok.*“
- v roku 2014, spoločné riešenie projektu APVV bilaterálnej spolupráce medzi Slovenskou a Rumunskou republikou: *Monitoring obsahu antokyánov vo vybraných rastlinných druhoch a stanovenie ich antioxidačných vlastností*, SK-RO-0002-12, s cieľmi: - kvalitatívna analýza a porovnanie zastúpenie antokyánov v rastlinných plodoch v rámci krajín zberu, použitého druhu rozpúšťadla na extrakciu a vplyvu lyofilizácie na stabilitu antokyánov a realizované pracovné cesty na Univerzitu medicíny a farmácie „Grigore T. Popa“ v Iasi, Rumunsko.