

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) RU<sup>(11)</sup>

2138509<sup>(13)</sup> C1

(51) МПК<sup>6</sup> C07J75/00, A61K35/78,  
A61K31/575

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 27.09.2016 - прекратил действие  
Пошлина: учтена за 11 год с 23.12.2007 по 22.12.2008

(21), (22) Заявка: 97121539/14, 22.12.1997

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
22.12.1997

(45) Опубликовано: 27.09.1999

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: Пунегов В.В. и др. Особенности  
технологии получения экдистероидов  
растения *Serratula coronata* L. методом  
твердофазной экстракции. В: "Новые и  
нетрадиционные растения и перспективы их  
практического использования". Тезисы  
докладов II международного симпозиума.  
-Пушино: 1997, т.2, с.79-81. SU 1146050 А,  
23.03.85. RU 2063763 С1, 20.07.96.

Адрес для переписки:  
167610, Сыктывкар, ул.Коммунистическая, 24,  
КНЦ УрО РАН, пат.отдел

(71) Заявитель(и):

Институт биологии Коми научного центра  
Уральского отделения РАН

(72) Автор(ы):

Пунегов В.В.,  
Мишуров В.П.,  
Никитина Е.Н.

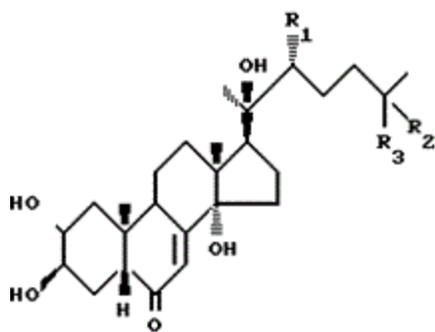
(73) Патентообладатель(и):

Институт биологии Коми научного центра  
Уральского отделения РАН

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКДИСТЕРОИДОВ РАСТЕНИЯ РОДА *SERRATULA*  $\alpha$  ЭКДИЗОНА,  $\beta$   
ЭКДИЗОНА И ИНОКОСТЕРОНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области технологии фитопрепаратов, а именно к способу одновременного  
получения трех фитоэкдистероидов;  $\alpha$ -экдизона (1),  $\beta$ -экдизона (2) и инокостерона (3) из растения  
*Serratula coronata*.



1:  $R_1=H$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=CH_3$ ;

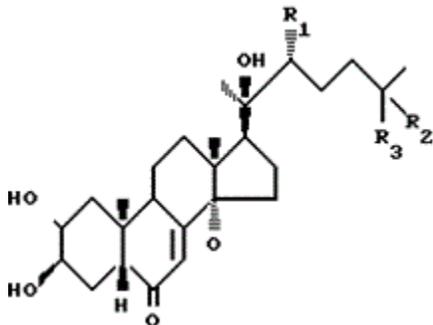
2:  $R_1=OH$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=CH_3$ ;

3:  $R_1=OH$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=CH_2-OH$ .

Способ основан на экстракции надземной массы растения смесью этанол-вода, реэкстракции липофильных примесей углеводородным растворителем, осветлении экстракта электрокоагуляцией фенолов, белков и пигментов, твердофазной экстракции фитостероидов с применением сорбента, содержащего на поверхности пор гексадецилдиметилсилановый функциональный покров, селективном элюировании с сорбента фитостероидов смесью полярный органический растворитель - вода и позволяет интенсифицировать и упростить процесс, повысить качество целевого продукта. 1 табл.

Изобретение относится к области получения биологически активных веществ из растений, а именно  $\alpha$ -экдизона  $2\beta$ -, $3\beta$ -, $14\alpha$ -, $22R$ , $25$ -пентагидрокси- $5\beta$ -холест-7-ен-6-он) (1),  $\beta$ -экдизона  $2\beta$ -, $3\beta$ -, $14\alpha$ -, $20R$ , $22R$ , $25$ -гексагидрокси- $5\beta$ -холест-7-ен-6-он) (2) и инокостерона  $2\beta$ -, $3\beta$ -, $14\alpha$ -, $20R$ , $22R$ , $25S$ , $26$ -гексагидрокси- $5\beta$ -холест-7-ен-6-он) (3).

Фитоэкдистероиды формулы 1, 2, 3 могут быть использованы в медицине, животноводстве, биотехнологии и научных исследованиях.



1:  $R_1 = H$ ;  $R_2 = OH$ ;  $R_3 = CH_3$ ;

2:  $R_1 = OH$ ;  $R_2 = OH$ ;  $R_3 = CH_3$ ;

3:  $R_1 = OH$ ;  $R_2 = H$ ;  $R_3 = CH_2-OH$ .

Известен способ одновременного получения  $\alpha$ - и  $\beta$ -экдизонов из надземной части растений *Serratula inermis*, включающий измельчение сырья, экстракцию метанолом с одновременным упариванием экстракта, разбавление водой, фильтрование, многократную обработку гексаном, экстракцию фитоэкдистероидов этилацетатом из водного слоя, упаривание этилацетата, хроматографическую очистку на колонке с оксидом алюминия смесью метанол-хлороформ, упаривание элюата, растворение продукта в метаноле и последующее упаривание метанола (или фильтрация с предварительным вымораживанием при температуре от  $-40$  до  $-70^\circ\text{C}$ ) [1].

Недостатками известного способа являются многостадийность, применение токсичных органических растворителей: метанола, хлороформа, этилацетата, большая продолжительность процесса (11 операций на 66 - 70 ч).

Известен способ одновременного получения  $\alpha$ - и  $\beta$ -экдизонов из надземной части растений *Serratula coronata*, включающий измельчение сырья, экстракцию водой, твердофазную экстракцию (ТФЭ) фитоэкдистероидов путем фильтрования водного экстракта через гидрофобный сорбент, селективного элюирования экдизонов с сорбентом водно-метанольной смеси, упаривания полученных фракций, содержащих  $\alpha$ - и  $\beta$ -экдизоны, хроматографического разделения  $\alpha$ - и  $\beta$ -экдизонов, многократной перекристаллизации экдизонов в смеси этилацетат-метанол и высушивания целевых продуктов в вакууме [2].

Недостатками известного способа являются многостадийность, применение высокотоксичных растворителей: метанол, этилацетат, большая продолжительность процесса (8 операций на 35 ч). Наиболее длительной стадией является многократная перекристаллизация продуктов, необходимость проведения которой обусловлена загрязнением фракций экдизонов растительными фенольными соединениями, элюирующимися с гидрофобных сорбентов совместно с экдизонами. Кроме того, в результате конкурентной сорбции фенольных соединений уменьшается сорбционная емкость гидрофобных сорбентов и селективность разделения экдизонов. К недостаткам известного способа следует также отнести невозможность длительного хранения водного экстракта *Serratula coronata* в производственных условиях. Экстракт чрезвычайно легко заражается дрожжевыми и плесневыми грибами и через несколько часов при хранении в комнатных условиях становится непригодным для осуществления способа в результате загрязнения микотоксинами и биодеструкции фитоэкдистероидов.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому результату является способ

одновременного получения  $\alpha$ - и  $\beta$ - экизона (синоним 20-гидроксиэкизона) и инокостерона из надземной части растения *Serratula coronata*, включающий измельчение сырья, экстракцию целевых продуктов водой, реэкстракцию гидрофобных сопутствующих веществ углеводородным растворителем, осаждение фенольных соединений из водного экстракта сульфатом цинка, твердофазную экстракцию экидистероидов путем фильтрования осветленного водного экстракта через сорбент "Диасорб С16 Т", селективное элюирование экидистероидов с сорбента растворителем, концентрирование полученных фракций с экидистероидами, перекристаллизацию целевых веществ и вакуумную сушку экидистероидов [3].

Задачей настоящего изобретения является упрощение способа одновременного получения  $\alpha$ - и  $\beta$ -экизонов и инокостерона за счет улучшения сохраняемости экстракта *Serratula coronata* в производственных условиях в результате применения водно-этанольных экстрагентов и исключения опасности заражения экстракта микрофлорой и биодеструкции фитоэкидистероидов; интенсификация способа за счет осуществления электрокоагуляции сопутствующих фенольных соединений, белков и пигментов вместо применения токсичного коагулянта сульфата цинка, предполагающего большие затраты дистиллированной воды при промывке сорбента на стадии твердофазной экстракции фитоэкидистероидов; дополнительная интенсификация способа получения экидистероидов формул 1, 2, 3 за счет уменьшения длительности стадий концентрирования очищенных фракций экидистероидов, кристаллизации целевых продуктов и их вакуумной сушки за счет осуществления концентрирования фракций экидистероидов вакуум-распылительной сушкой, осуществления перекристаллизации экидистероидов с одновременным упариванием маточных растворов в вакууме; повышение варибельности технологического оформления способа за счет увеличения перечня растворителей, пригодных для осуществления способа. В этом состоит новый технический результат, находящийся в причинно-следственной связи с существенными признаками изобретения.

Существенными признаками способа получения  $\alpha$ - и  $\beta$ -экизонов и инокостерона из растения рода *Serratula* являются экстракция надземной части растения *Serratula coronata* смесью вода - этиловый спирт в соотношении 3:(1-9) с одновременным упариванием экстракта, осветление сгущенного экстракта реэкстракцией углеводородным растворителем, осаждение сопутствующих фенольных соединений, водорастворимых белков и пигментов из полученного водного остатка электрокоагуляцией с применением электродов из стеклографита, алюминия, цинка, железа или их сплавов, твердофазная экстракция (ТФЭ) фитоэкидистероидов на силикагеле, содержащем на поверхности пор гексадецилдиметилсилановый функциональный покров фильтрацией осветленного экстракта через емкость с сорбентом, селективное градиентное элюирование фитоэкидистероидов с сорбента смесью вода-спирт с объемным соотношением (99:1) в начале элюирования и 2:3 - в конце элюирования, объединение полученных фракций, содержащих индивидуальные фитоэкидистероиды по результатам ВЭЖХ-анализа, вакуум-распылительное высушивание полученных фракций, перекристаллизация фитоэкидистероидов из безводного этилового спирта с одновременным упариванием маточного раствора в вакууме и сушки целевых продуктов в вакууме. Предлагаемый способ конкретизируется следующими примерами:

Пример 1. 2 кг измельченного сырья растения *Serratula coronata* (вся надземная часть), содержащего по результатам ВЭЖХ-анализа в сумме 1,3% альфа- и бета-экизонов и инокостерона, помещают в экстрактор вакуум-циркуляционной установки, заливают 20 л смеси вода-этиловый спирт 3:2 и экстрагируют в течение 8 ч. В приемной колбе собирают концентрат экстракта в количестве 2 л. Экстракт помещают в перколятор и с применением 1,5 л петролейного эфира экстрагируют липофильные пигменты, воска и липиды. Осветленный экстракт вносят в электролизер, снабженный электродами из стеклографита и алюминия и в течение 10 мин осуществляют электрокоагуляцию растительных фенолов, белков и пигментов в электрическом поле напряженности 10 В/см, силы тока 2 А и плотности тока 0,02 А/см<sup>2</sup> и фильтруют. В результате электрокоагуляции содержание сопутствующих веществ в экстракте уменьшается на 4,6 процента в пересчете на массу исходного растительного сырья. Фильтрат прокачивают для осуществления твердофазной экстракции фитоэкидистероидов через емкость, содержащую 1,8 кг сорбента "Диасорб С16 Т", имеющего на поверхности пор силикагеля гексадецилдиметилсилановый функциональный покров. По окончании прокачивания фильтрата сорбент в емкости промывают прокачиванием через емкость 5 л дистиллированной воды и элюируют  $\beta$ -экизон водно-спиртовой смесью в количестве 5 л с линейно возрастающим градиентом концентрации спирта от 5 до 30%,

затем элюируют с сорбента инокостерон прокачивая через емкость с сорбентом 0,5 л 35%-ного этилового спирта и наконец элюируют с сорбента  $\alpha$ -экдизон водно-спиртовой смесью в количестве 3 л с линейно возрастающим градиентом концентрации спирта от 35 до 60%. Полученные фракции анализируют методом обращеннофазовой ВЭЖХ на хроматографе "Милихром" при детектировании поглощения УФ-излучения на длине волны 242 нм с применением аналитической колонки длиной 80 мм, внутренним диаметром 2 мм, заполненной сорбентом "Диасорб 130 С16Т, 6 мкм" (ТОО "Медикант" г. Орел) и элюента метанол-бутанол-вода (38:1:61). По результатам анализа фракции объединяют и экдистероиды высушивают в вакуум-распылительной сушилке в течение 5 мин. 21,7 г  $\beta$ -экдизона растворяют в 1 л безводного этанола при кипячении, раствор фильтруют и перекристаллизовывают  $\beta$ -экдизон при  $-25^{\circ}\text{C}$  с одновременной вакуум-выпаркой этанола в течение 20 мин. Полученную кристаллическую массу промывают 0,05 л безводного этанола, охлажденного до  $-30^{\circ}\text{C}$  и сушат в вакууме. Получают: 21,5 г бета-экдизона с содержанием основного вещества 97,3%. Аналогично перекристаллизовывают инокостерон и  $\alpha$ -экдизон, применяя, соответственно для перекристаллизации 3,7 г инокостерона 0,2 л этанола, а для перекристаллизации 1,9 г  $\alpha$ -экдизона 0,15 л этанола. Получают 3,5 г инокостерона с содержанием основного вещества 92,7%, 1,8 г  $\alpha$ -экдизона с содержанием основного вещества 98,6%.

Пример 2. Получение фитоэкдистероидов осуществляют аналогично примеру 1, но для экстракции растительного сырья используют смесь вода-спирт 3:1. После перекристаллизации получают 22,3 г  $\beta$ -экдизона с содержанием основного вещества 97,2%, 3,7 г инокостерона с содержанием основного вещества 91,4% и 2,40 г  $\alpha$ -экдизона с содержанием основного вещества 98,1%.

Пример 3. Получение  $\alpha$ - и  $\beta$ -экдизонов и инокостерона осуществляют аналогично примеру 1, но для экстракции растительного сырья используют смесь вода-спирт 1: 3. После перекристаллизации получают 20,5 г  $\beta$ -экдизона с содержанием основного вещества 97,5%, 3,3 г инокостерона с содержанием основного вещества 93,8% и 2,80 г  $\alpha$ -экдизона с содержанием основного вещества 98,8%.

Примеры 4 - 8. (Таблица 1.) Получение  $\alpha$ - и  $\beta$ -экдизонов и инокостерона осуществляют аналогично примеру 1, но для элюирования фитоэкдистероидов с сорбента "Диасорб С16-Т" используют водные растворы полярных органических растворителей (изопропанол, пропанол, бутанол, изобутанол, ацетон) в соотношении от 99:1 до 40:60.

Пример 9. Получение  $\alpha$ - $\beta$ -экдизонов и инокостерона осуществляют аналогично примеру 1, но перекристаллизацию экдистероидов проводят в среде безводного ацетона. 21,8 г  $\beta$ -экдизона растворяют в 3 л безводного ацетона при кипячении, раствор фильтруют, охлаждают до  $-25^{\circ}\text{C}$  с одновременным упариванием ацетона в вакууме, полученную суспензию кристаллов  $\beta$ -экдизона промывают 0,1 л охлажденного до  $-30^{\circ}\text{C}$  безводного ацетона и сушат в вакууме. Получают 21,4 г  $\beta$ -экдизона с содержанием основного вещества 97,2%. Аналогично перекристаллизовывают 3,6 г инокостерона и 1,95 г  $\alpha$ -экдизона, но для этого используют соответственно 0,3 и 0,25 л безводного ацетона. Получают 3,5 г инокостерона и 1,88 г  $\alpha$ -экдизона с содержанием основного вещества соответственно 92,8 и 99,4%.

Пример 10. Получение  $\alpha$ - $\beta$ -экдизонов и инокостерона и их перекристаллизацию осуществляют аналогично примеру 9, но для перекристаллизации используют безводную смесь ацетон: этанол в объемном соотношении 3:2. Получают 21,26 г  $\beta$ -экдизона, 3,48 г инокостерона и 1,86 г  $\alpha$ -экдизона с содержанием основного вещества соответственно 97,0%, 92,5% и 99,1%.

Пример 11. Получение  $\alpha$ - $\beta$ -экдизонов и инокостерона осуществляют аналогично примеру 1, но электрокоагуляцию сопутствующих веществ осуществляют с применением электродов из стеклографита и железа (сталь 18Х25Т) в течение 10 мин при силе тока 2,4 А, удельной плотности тока 0,02 А/см<sup>2</sup>, напряженности электрического поля 10 В/см. В результате электрокоагуляции содержание сопутствующих веществ в экстракте уменьшается на 4,7 процента в пересчете на массу исходного растительного сырья. Получают: 21,5 г  $\beta$ -экдизона с содержанием основного вещества 97,5%, 3,5 г инокостерона с содержанием основного вещества 93,0%, 1,8 г  $\alpha$ -экдизона с содержанием основного вещества 98,6%.

Примеры 12, 13. Получение  $\alpha$ - $\beta$ -экдизонов и инокостерона осуществляют аналогично примеру 1, но электрокоагуляцию сопутствующих веществ осуществляют с применением электродов из стеклографита и цинка (пример 12) или стеклографита и сплава АМг3 (пример 13) в течение 10 мин при силе тока 2,4 А, удельной плотности тока 0,02 А/см<sup>2</sup>, напряженности электрического поля 10 В/см. В результате электрокоагуляции по примеру 12 содержание сопутствующих веществ в экстракте уменьшается на 5,2 процента в пересчете на массу исходного растительного сырья. В результате электрокоагуляции по примеру 13 содержание сопутствующих веществ в экстракте уменьшается на 4,9 процента в пересчете на массу исходного растительного сырья. Получают по примеру 12: 21,4 г  $\beta$ -экдизона с содержанием основного вещества 97,8%, 3,5 г инокостерона с содержанием основного вещества 93,2%, 1,8 г  $\alpha$ -экдизона с содержанием основного вещества 99,0%. По примеру 13 получают: 21,5 г  $\beta$ -экдизона с содержанием основного вещества 97,7%, 3,5 г инокостерона с содержанием основного вещества 93,4%, 1,8 г  $\alpha$ -экдизона с содержанием основного вещества 98,6%.

Время проведения известного способа 35 - 60 ч, а время проведения предлагаемого способа 24 - 30 ч.

В известном способе требуется применение токсичных органических растворителей: метанола, этилацетата, а в предлагаемом способе применяется малотоксичный этиловый спирт или водно-спиртовые смеси для экстракции фитоэкдистероидов из растительного сырья и относительно малотоксичные ацетон, пропиловые и бутиловые спирты для фракционирования фитоэкдистероидов методом твердофазной экстракции.

Таким образом, предлагаемый способ упрощает технологию одновременного получения  $\alpha$ - и  $\beta$ -экдизонов, позволяет кроме экдизонов получать инокостерон, сокращает время получения целевых продуктов, повышает вариабельность технологического оформления способа за счет увеличения перечня растворителей, пригодных для осуществления способа.

Литература

1. Авторское свидетельство СССР N 1146050, А 61 К 35/78, 23.03.85.
2. Патент РФ N 2063763, А 61 К 35/78, 20.07.96.
3. Пунегов В.В., Мишуров В.П., Никитина Е.Н., Коснырева И.В. Особенности технологии получения экдистероидов растения *Serratula coronata* L. методом твердофазной экстракции. Тез. докл. Второго междунар. симп. "Новые и нетрадиционные растения и перспективы их практического использования". - Пущино, 1997, т. 2, с. 79 - 81.

#### Формула изобретения

Способ получения экдистероидов растения рода *Serratula*  $\alpha$ -экдизона,  $\beta$ -экдизона и инокостерона путем экстракции измельченного сырья полярным растворителем с одновременным упариванием экстракта, последующей реэкстракции гидрофобных примесей углеводородным растворителем, селективного осаждения фенольных соединений из экстракта, твердофазной экстракции экдистероидов фильтрованием экстракта через сорбент, содержащий на поверхности пор гексадецилдиметилсилановый функциональный покров, элюирования с сорбента сопутствующих веществ и экдистероидов смесью вода-органический растворитель, концентрирования

экдистероидов в полученных фракциях, перекристаллизации экдистероидов и сушки, отличающийся тем, что экстрагируют надземную массу растений *Serratula coronata* L. смесью вода-этанол в соотношении 3 : (1-9) с одновременным сгущением экстракта, полученный экстракт осветляют осаждением растительных фенолов, пигментов и белков электрокоагуляцией с применением электродов из стекло-графита, алюминия, цинка, железа или их сплавов, элюируют экдистероиды -  $\beta$ -экдизон, инокостерон и  $\alpha$ -экдизон с сорбента смесью вода - органический растворитель формулы  $R^1-OH$  или  $R^2-(C=O)-R^2$ , где  $R^1$  - этил-, изо-пропил-, пропил-, бутил-, изо-бутил-,  $R^2$  - метил-, с возрастающим градиентом концентрации органического растворителя в смеси, концентрирование экдистероидов из элюатов осуществляют распылительной сушкой в вакууме, перекристаллизацию экдистероидов осуществляют из безводного этанола, ацетона или их смеси с одновременным упариванием маточного раствора в вакууме.

#### РИСУНКИ

##### [Рисунок 1](#)

---

**ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе**

Дата прекращения действия патента: **23.12.2008**

Дата публикации: [10.05.2011](#)

---