



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006126404/15, 20.07.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
20.07.2006

(45) Опубликовано: 10.04.2008 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2276991 C1, 27.05.2006. RU 2138509 C1, 27.09.1999. RU 2230749 C1, 20.06.2004. RU 2151608 C1, 27.06.2000. Сыров В.Н. Фитозкдистероиды: биологические эффекты в организме высших животных и перспективы использования в медицине. - Эксперимен. и клин. фармакол., 1964, т.57, 5, с.61-65. RU 2119331 C1, 27.08.1998.

Адрес для переписки:

167982, г.Сыктывкар, ул. Коммунистическая,  
24, Коми НЦ УрО РАН, патентно-лицензионный  
отдел

(72) Автор(ы):

Пунегов Василий Витальевич (RU),  
Сычев Роман Леонидович (RU),  
Зайнуллин Владимир Габдулович (RU),  
Башлыкова Людмила Анатольевна (RU),  
Федоров Владимир Николаевич (RU),  
Смирнов Николай Алексеевич (RU),  
Сидоров Александр Вячеславович (RU),  
Раков Андрей Александрович (RU),  
Пунегова Наталия Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Институт биологии Коми научного центра  
Уральского отделения Российской академии  
наук (RU),  
ГОУ ВПО "Ярославская государственная  
медицинская академия Росздрави" (RU)

(54) СРЕДСТВО "ЭКДИСТЕРОН-80", ОБЛАДАЮЩЕЕ КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ, АДАПТОГЕННОЙ, АНТИГИПОКСИЧЕСКОЙ, ГАСТРОПРОТЕКТОРНОЙ, ТЕРМОПРОТЕКТОРНОЙ, АНАБОЛИЧЕСКОЙ И АКТОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, И СПОСОБ ЕГО ПРОИЗВОДСТВА

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к созданию средства природного происхождения с широким спектром действия. Средства представляет собой высокоочищенную гидрофильную фракцию экдистероидов растения *Serratula coronata* L. в кристаллическом состоянии, содержащую не менее 80% (массовая доля) 20-гидроксиэкдизона, 8-11% 25S-инокостерона и 5,9-9,8%  $\alpha$ -экдизона. Способ производства средства основан на применении в качестве сырья всей надземной массы растения, собранной в фазе вегетации или массовой бутонизации, но до начала цветения исключительно с культурных плантаций. Способ реализован экстракцией термообработанного сырья водно-этанольными смесями настаиванием и (или)

ультразвуковой обработкой суспензии сырья-экстрагент, упариванием экстракта, сорбционной фильтрации, преципитации осветленного экстракта на оксид алюминия, флэш-хроматографического выделения фитозкдистероидов, выборочного объединения и упаривания фракций, содержащих мажорные фитозкдистероиды растения на основании результатов ВЭЖХ анализа, перекристаллизации полученного продукта и его сушки в вакууме. Средства вызывает нормализацию гормонального баланса в организме при хронической сердечной недостаточности, гипоксии, гипер- и гипотермии, стрессе, увеличение работоспособности и продление жизни в экстремальных условиях существования, предотвращение изъязвления слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта при стрессе и т.д. 2 н.п. ф-лы, 11 табл., 6 ил.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*A61K 36/28* (2006.01)*A61P 43/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006126404/15, 20.07.2006**(24) Effective date for property rights: **20.07.2006**(45) Date of publication: **10.04.2008 Bull. 10**

Mail address:

**167982, g.Syktvykar, ul. Kommunisticheskaja,  
24, Komi NTs UrO RAN, patentno-litsenzionnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Punegov Vasilij Vital'evich (RU),  
Sychev Roman Leonidovich (RU),  
Zajnullin Vladimir Gabdulovich (RU),  
Bashlykova Ljudmila Anatol'evna (RU),  
Fedorov Vladimir Nikolaevich (RU),  
Smirnov Nikolaj Alekseevich (RU),  
Sidorov Aleksandr Vjacheslavovich (RU),  
Rakov Andrej Aleksandrovich (RU),  
Punegova Natalija Vasil'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Institut biologii Komi nauchnogo tsentra  
Ural'skogo otdelenija Rossijskoj akademii  
nauk (RU),  
GOU VPO "Jaroslavskaja gosudarstvennaja  
meditsinskaja akademija Roszdrava" (RU)**

**(54) AGENT "EKDISTERON-80" POSSESSING CARDIOPROTECTIVE, ADAPTOGENIC, ANTI-HYPOXIC, GASTROPROTECTIVE, THERMOPROTECTIVE, ANABOLIC AND ACTOPROTECTIVE ACTIVITY AND METHOD FOR ITS PRODUCTION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutical industry and technology, pharmacy.

SUBSTANCE: invention relates creature of natural agent showing the broad spectrum of effect. Proposed agent represents highly purified fraction of ecdysteroids from plant *Serratula coronata* L. prepared in a crystalline state and comprising and comprising at least 80% (mass part) of 20-hydroxyecdisonone, 8-11% of (25S)-inocsterone and 5.9-9.8% of  $\alpha$ -ecdysone. Method for producing this agent is based on using all above-ground mass of plant as the raw that is gathered in phase of vegetation or total budding but before flowering and from cultural plantations only. Method involves extraction of the preliminary heat-treated raw with aqueous-ethanol mixtures by infusion and/or ultrasonic

oscillation treatment of the suspension raw-extractant, evaporation of extract, sorption filtration, precipitation of a cleared extract on aluminum oxide, flash-chromatography isolation of phytoecdysteroids, selective combination and evaporation of fractions containing major phytoecdysteroids of plant based on HPLC analysis followed by recrystallization of prepared product and its drying under vacuum. Agent provides normalization of the hormonal balance in body in patients with chronic cardiac insufficiency, hypoxia, hyper- and hypothermia, stress, increasing working ability and elongation of span-life under extreme conditions of existing, prevention of ulceration of digestive tract mucosa in stress and others.

EFFECT: valuable medicinal properties of agent.

2 cl, 11 tbl, 6 dwg, 14 ex

RU 2 3 2 1 4 2 0 C 1

RU 2 3 2 1 4 2 0 C 1

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и касается способа производства лечебного препарата на основе фитоэкидистероидов, которое может быть применено в качестве средства при хронической сердечной недостаточности, стрессе, гипоксии, гипер- и гипотермии и для предотвращения изъязвления слизистой оболочки

5 желудочно-кишечного тракта при стрессе, а также для повышения работоспособности и продления жизнедеятельности сотрудников спецслужб, военнослужащих в экстремальных условиях.

Среди средств растительного происхождения, содержащих фитоэкидистероиды, нами не выявлен препарат, обладающий комплексом вышеперечисленных свойств.

10 Известно тонизирующее средство экистен, полученное из корней растения *Rhaponticum carthamoides* (Wild) Iljin (левзеи сафлоровидной) [А.с.1312774 СССР, кл. А61К 35/78].

Указанное средство обладает адаптогенной, актопротекторной активностью, является неспецифическим биостимулятором для человека и животных. Недостатком средства является то, что в качестве сырья используются корни с корневищами левзеи

15 сафлоровидной, характеризующиеся низким содержанием 20-гидроксиэкидизона (массовая доля в среднем составляет 0,1%), что обуславливает высокую себестоимость готового тонизирующего средства экистен.

Наиболее близким к заявленному является средство «Серпистен» (Патент РФ №2276991 от 27.05.2006), действующим началом которого является смесь экидистероидов: 20-гидроксиэкидизона и 25S-инокостерона, выделенная из надземной части растения рода

20 *Serratula*, собранных в фазе вегетации, массовой бутонизации или начала цветения.

Недостатком указанного средства является отсутствие в его составе физиологически наиболее ценного и дорогостоящего мажорного фитоэкидистероида растений рода *Serratula* -  $\alpha$ -экидизона, утрачиваемого в процессе получения. Кроме того, предлагается

25 использовать средство только как актопротекторное и тонизирующее средство, что снижает практическую значимость средства для медицины экстремальных ситуаций.

Наиболее близким техническим решением, принятым за прототип, по способу производства является способ одновременного получения  $\beta$ -экидизона (синонимы - экидистерон, 20-гидроксиэкидизон), инокостерона и  $\alpha$ -экидизона из надземной массы растения

30 рода *Serratula* L. [Патент 2138509, Россия от 27.09.1999.] путем экстракции измельченного растительного сырья смесью вода-этанол с одновременным упариванием, реэкстракции гидрофобных примесей углеводородным растворителем, осветления экстракта осаждением фенолов, белков и пигментов электрокоагуляцией, твердофазной экстракции экидистероидов с применением сорбента, содержащего на поверхности пор гексадецилдиметилсилановый функциональный покров, элюирования экидистероидов с

35 сорбента смесью вода-полярный органический растворитель, концентрирования экидистероидов распылительной сушкой в вакууме, их перекристаллизации из этанола, ацетона или их смеси и окончательной сушки в вакууме готового продукта. Недостатками указанного способа являются многостадийность, применение большого перечня органических растворителей (петролейный эфир, этиловый спирт, ацетон, смеси этанол-ацетон-вода), применение дорогостоящего сорбента для хроматографической очистки экидистероидов (Диасорб С16 Т), не подлежащего полной регенерации после 8-12 циклов твердофазной экстракции, высокие удельные расходы органических растворителей, электроэнергии и дистиллированной воды в пересчете на 1 кг экидистероидов.

45 Технический результат настоящего изобретения состоит в расширении арсенала средств специального назначения и лечебных препаратов, обладающих кардиопротекторной, адаптогенной, антигипоксической, гастропротекторной, термопротекторной, анаболической и актопротекторной активностью; более полном использовании биопотенциала растения *Serratula coronata*, а также в упрощении способа производства средства на основе фитоэкидистероидов и в снижении себестоимости средства с одновременным повышением

50 его качества.

Технический результат достигается тем, что в качестве кардиопротекторного, адаптогенного, антигипоксического, гастропротекторного, термопротекторного, анаболического и актопротекторного средства применяют сумму фитоэкидистероидов,

включающую не менее 80% 20-гидроксиэкдизона, 8-11% 25S-инокостерона и 5,9-9,8%  $\alpha$ -экдизона, полученную из надземной массы растения *Serratula coronata* L., собранной в фазу вегетации или массовой бутонизации до начала цветения; упрощение способа производства средства получено за счет исключения стадии электрокоагуляции фенольных и белковых соединений в экстракте растения, повышения вариабельности технологического процесса, исключения стадии жидкостно-жидкостной экстракции органическим растворителем или твердофазной экстракции экдистероидов из водной фазы.

Измельченное растительное сырье экстрагируют настаиванием 70-96% этанолом при гидромодуле процесса 1:(9-15) в течение 4,5-36 ч, или до экстракции предварительно обрабатывают (1-3 мин) водяным паром или кипящей дистиллированной водой с удельным расходом 2,6 л/кг сырья, или прогревают в микроволновой печи до 100°C, экстрагируют трехкратно при кратковременном воздействии в течение 5 мин ультразвуком на суспензию растительное сырье-экстрагент, отделяют экстракт фильтрованием и упаривают в вакууме при температуре не более 50°C, затем экстракт осветляют фильтрованием через сорбент формулы  $M_xO_y$ , (где  $M=Si$ , или  $Mg$ , или  $Al$ ,  $x=1$  или  $2$ ,  $y=1-3$ ) или смесь указанных сорбентов, осветленный экстракт подвергают преципитации на оксид алюминия при соотношении сухой остаток-сорбент 1:9 с последующей сушкой в вакууме, далее преципитат помещают в колонку для флэш - хроматографии поверх оксида алюминия дисперсности 40-80 мкм и элюируют фитоэкдистероиды смесью этилацетат-этанол с градиентом концентрации этанола от 0% до 96%, этилацетат-этанольные фракции, содержащие фитоэкдистероиды (20-гидроксиэкдизон, инокостерон и  $\alpha$ -экдизон), объединяют, руководствуясь результатами ВЭЖХ анализа, концентрируют упариванием растворителя и с последующей сушкой продукта в вакууме, осуществляют перекристаллизацию фитоэкдистероидов двукратно из смеси этилацетат-этанол и однократно из безводного этанола с охлаждением до -72°C с промежуточным фильтрованием через фильтр с диаметром пор не более 0,2 мкм. Финишную перекристаллизацию продукта осуществляют в безводном этаноле с расходом 0,0034 л/г продукта. Кристаллический продукт сушат в вакууме. Готовый продукт - средство «Экдистерон-80» - представляет собой белый без оттенка желтизны мелкокристаллический порошок с температурой плавления в интервале 241-242°C. ИК-Фурье спектр средства приведен на фиг.1., УФ спектр - на фиг.2.

Для выполнения контроля качества готовой продукции и исходного растительного сырья применяют методику количественного определения фитоэкдистероидов в растительном сырье и лекарственных формах [Пунегов В.В., Савиновская Н.С. Метод внутреннего стандарта для определения экдистероидов в растительном сырье и лекарственных формах с помощью ВЭЖХ // Раст.ресурсы. - 2001. - Т. 37. - вып.1. - С.97-102.] Состав и хроматографический профиль средства «Экдистерон-80» отражен на фиг.3. Средство содержит в качестве основных компонентов не менее 80% (массовая доля) 20-гидроксиэкдизона (холест-7-ен-6-он, 2,3,14,20,22,25-гексагидрокси-, (2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,20R,22R)-); 8-11% инокостерона (холест-7-ен-6-он, 2,3,14,20,22,26-гексагидрокси-, (2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,14 $\alpha$ ,20R,22R,25S)-); и 5,9-9,8%  $\alpha$ -экдизона (холест-7-ен-6-он, 2,3,14,22,25-гексагидрокси-(2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,14 $\alpha$ ,22R)-) в зависимости от качества исходного сырья.

Методом хромато-масс спектрометрии триметилсилильных производных экдистероидов в составе средства «Экдистерон-80» в следовых количествах обнаружены интегристерон А, макистерон А, 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизон. Химическая структура мажорных экдистероидов, входящих в состав средства «Экдистерон-80», приведена на фиг.4.

Способ производства средства «Экдистерон-80» конкретизируется следующими примерами.

Пример 1. Надземную массу *Serratula coronata* собирают в фазе развития вегетация - массовая бутонизация, но до начала цветения. Растительное сырье сушат и измельчают. В результате анализа средней пробы растительного сырья методом ВЭЖХ было найдено, что массовая доля 20-гидроксиэкдизона составляет 1,16%, 25S-инокостерона

0,15%,  $\alpha$ -экдизона - 0,12%. Измельченное растительное сырье, содержащее 1,43% экдистероидов, в количестве 4 кг вносят в экстракционную емкость, при перемешивании приливают 40 л 70% этанола и настаивают сырье в течение 12 ч. Первичный экстракт фильтруют, а к растительному остатку в экстракционной емкости вносят повторно 70% этанол и при гидромодуле 10 осуществляют повторную и аналогично третью экстракцию сырья настаиванием по 12 ч. Общая продолжительность стадии экстракции 36 ч. Отфильтрованные экстракты объединяют и упаривают этанол на роторном испарителе в вакууме при температуре 50°C. От сгущенного и разбавленного до 2,5 л дистиллированной или деионизированной водой экстракта сорбционной фильтрацией отделяют хлорофилльно-каротиноидную пасту, агликоны флавоноидов и фенольных кислот. Сорбентом являлся оксид алюминия дисперсности 100-160 мкм. Водный осветленный экстракт смешивают с оксидом алюминия в соотношении сухой остаток - сорбент 1:9, упаривают на роторном испарителе и сушат в вакууме при температуре 50°C до получения преципитата экстракта на сорбенте. Продолжительность стадии сорбционного фракционирования, преципитации и сушки преципитата - 6 ч.

Из отработанного сырья отгоняют этанол, который после дополнительной очистки используют многократно для экстракции сырья.

Концентрирование экдистероидов флэш-хроматографией: промежуточный продукт - преципитат на оксиде алюминия - в количестве 0,4 кг вносят в хроматографическую колонну, содержащую 1 кг оксида алюминия для флэш-хроматографии с размером частиц 40-80 мкм. Высота слоя чистого сорбента в колонне 15 см, внутренний диаметр 20 см, высота слоя порошкообразного преципитата экстракта на оксиде алюминия -  $2 \pm 0,5$  см. Выполняют градиентное элюирование веществ с колонны этилацетатом, смесью этилацетат-этанол с повышением объемной доли 96%-ного этанола от 0 до 100%. Фракции, содержащие фитоекдистероиды, получаемые в результате хроматографии, объединяют на основании данных ВЭЖХ-анализа аликвот, упаривают в вакууме досуха и переносят в кристаллизатор. Расход растворителей: этилацетат - 8 л, этиловый спирт ректифицированный высшей очистки - 6 л. Продолжительность стадии флэш-хроматографического обогащения экдистероидов - 2 ч.

Очистка средства «Экдистерон-80» осуществляют перекристаллизацией из смеси этанол-этилацетат. Для этого концентрат экдистероидов в количестве 58 г растворяют в минимальном количестве (0,2 л) горячего этанола. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,2 мкм. Фильтрат смешивают с 1,4 л этилацетата в колбе-кристаллизаторе и помещают в морозильную камеру для кристаллизации с охлаждением до -72°C. Полученный кристаллический продукт отфильтровывают, промывают этилацетатом, кристаллическую массу вновь переносят в колбу-кристаллизатор и осуществляют аналогично повторную кристаллизацию продукта. Полученный кристаллический продукт с целью удаления следов этилацетата сушат в вакууме, переносят в колбу и при нагревании с перемешиванием вносят обезвоженный (абсолютный) этанол до полного растворения продукта (0,21 л). Раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор не более 0,2 мкм, переносят в колбу-кристаллизатор и помещают в морозильную камеру для кристаллизации. Полученный кристаллический продукт отфильтровывают и сушат в вакууме. Белое без оттенка желтизны кристаллическое средство в количестве 55,2 г хранят в герметичной таре. Результаты аналитического определения качества средства «Экдистерон-80» приведены в табл. 1. Продолжительность стадии перекристаллизации и сушки готового средства - 5 ч.

Рекуперацию растворителей осуществляют ректификацией, а утилизацию маточных растворов упариванием в вакууме досуха. Твердый остаток, представляющий собой смесь минорных липофильных экдистероидов серпухи венценосной и следов каротиноидов растения, является сопутствующим продуктом производства средства «Экдистерон-80». Его извлекают из отгонной колбы, сушат и фасуют. Смесью этилацетат-этанол перегоняют на ректификационной установке. Растворители после обезвоживания используют многократно для производства средства «Экдистерон-80».

Пример 2. Производство средства «Экдистерон-80» осуществляют аналогично примеру

1, но экстракцию растительного сырья проводят с предварительным увлажнением сырья горячей водой (100°C) с удельным расходом 2,6 л/кг сырья и затем разбавляют суспензию вода-сырье 96%-ным этиловым спиртом до гидромодуля 10 и настаивают сырье при периодическом перемешивании суспензии в течение 4,5 ч для получения первичного экстракта. Продолжительность стадии экстракции сырья в данном случае 28,5 ч.

Практический выход и состав средства отражены в табл. 1.

Примеры 3-4. Производство средства «Экдистерон-80» осуществляют аналогично примеру 2, но экстракцию растительного сырья проводят при гидромодулях 9 и 15. Практический выход и состав средства отражены в табл. 1.

Примеры 5-6. Производство средства «Экдистерон-80» осуществляют аналогично примеру 2, но объемная доля этилового спирта в экстрагенте для второй и третьей стадий экстракции составляет 15% (пример 5) и 75% (пример 6). Практический выход и состав средства отражены в табл. 1.

Примеры 7-10. Производство средства «Экдистерон-80» осуществляют аналогично примеру 2, но в качестве сорбентов при сорбционной фильтрации экстракта используют алусил (состав  $Al_2O_3 \cdot SiO_2$ ) (Пример 7), асканит-бентонит (состав  $Al_2O_3 \cdot (3-4)SiO_2 \cdot n H_2O$ ) (Пример 8), смесь оксида алюминия с асканит-бентонитом (1:1 по весу) (Пример 9), смесь асканита-бентонита с оксидом алюминия и алусилом (0,3:0,4:0,3 по весу) (Пример 10). Практический выход и состав средства отражены в табл. 1.

Пример 11. Производство средства «Экдистерон-80» осуществляют аналогично примеру 2, но дополнительно на первой стадии экстракции после термообработки горячей водой проводят обработку суспензии сырье-экстрагент ультразвуком удельной мощностью 39 Вт/л в течение 5 мин. Практический выход и состав средства отражены в табл. 1.

Пример 12. Производство средства «Экдистерон-80» осуществляют аналогично примеру 2, но вместо обработки сырья горячей водой осуществляют предварительную обработку сырья водяным паром при 100°C в течение 1 мин с удельным расходом 0,03 кг/кг сырья, затем экстрагируют трехкратно методом настаивания 70% этанолом при комнатной температуре при гидромодуле 10. Практический выход и состав средства отражены в табл. 1.

Пример 13. Производство средства «Экдистерон-80» осуществляют аналогично примеру 12, но растительное сырье обрабатывают горячим паром при 100°C не 1 а 3 мин с удельным расходом 0,09 кг/кг сырья и далее - аналогично примеру 2. Практический выход и состав средства отражены в табл. 1.

Примеры	Способ подготовки сырья к экстракции	Этанол % (объемный)	Гидромодуль	Время первой, второй, третьей экстракций, ч	Тип сорбента для осветления экстракта	Компонентный состав препарата, %			Практический выход, г и степень извлечения из сырья, %
						20Е	ИН	Е	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Без термообработки сырья до экстракции	70 70 70	10 10 10	12 12 12	Оксид алюминия	81,1	9,1	9,8	48,94 (85,56%)
2	Горячая вода, 100°C, расход 2,6 кг/кг сырья, 20 мин	96 70 70	10 10 10	4,5 12 12	Оксид алюминия	86,0	8,0	5,9	56,63 (99,0%)
3	Горячая вода, 100°C, расход 2,6 кг/кг сырья, 20 мин	96 70 70	9 9 9	4,5 12 12	Оксид алюминия	81,1	10,4	7,4	55,6 (97,2%)
4	Горячая вода, 100°C, расход 2,6 кг/кг сырья, 20 мин.	96 70 70	15 15 15	4,5 12 12	Оксид алюминия	81,3	11,1	7,2	56,86 (99,4%)
5	Горячая вода, 100°C, расход	96 15	10 10	4,5 12	Оксид алюминия	84,0	8,1	7,2	53,6 (93,7%)

	2,6 кг/кг сырья, 20 мин	15	10	12					
5	6 Горячая вода, 100°С, расход 2,6 кг/кг сырья, 20 мин	96 75 75	10 10 10	4,5 12 12	Оксид алюминия	81,1	11,0	7,4	55,77 (97,5%)
10	7 Горячая вода, 100°С, расход 2,6 кг/кг сырья, 20 мин	96 70 70	10 10 10	4,5 12 12	Алусил	81,4	11,2	7,0	56,74 (99,2%)
15	8 Горячая вода, 100°С, расход 2,6 кг/кг сырья, 20 мин	96 70 70	10 10 10	4,5 12 12	Асканит-бентонит	81,0	11,2	6,6	55,94 (97,8%)
20	9 Горячая вода, 100°С, расход 2,6 кг/кг сырья, 20 мин	96 70 70	10 10 10	4,5 12 12	Оксид алюминия + асканит-бентонит (1:1)	81,2	11,0	6,6	56,91 (99,5%)
	10 Горячая вода, 100°С, расход 2,6 кг/кг сырья, 20 мин	96 70 70	10 10 10	4,5 12 12					
	11 Горячая вода, 100°С, расход 2,6 кг/кг сырья, 20 мин, УЗ - 5 мин	96 70 70	10 10 10	4,5 12 12	Оксид алюминия	84,9	8,0	6,0	56,93 (99,53%)

25	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
30	12	Пар 100°С, 1 мин, расход 0,03 кг/кг сырья	70 70 70	10 10 10	4,5 12 12	Оксид алюминия	81,4	11,2	6,9	55,2 (96,53%)
35	13	Пар 100°С, 3 мин, расход 0,09 кг/кг сырья	70 70 70	10 10 10	4,5 12 12	Оксид алюминия	81,2	11,0	7,0	51,54 (91,1%)
	14	Разогрев суспензии сырье/вода в микроволновой печи до 100°С, расход воды 3,5 л/кг сырья	70 70 70	10 10 10	2,5 1,0 1,0	Оксид алюминия	85,7	7,9	5,8	56,63 (99,0%)
	Примечание к табл. 1: 20Е=20-гидроксиэкдизон, ИН=инокостерон, Е=α-экдизон, УЗ - дополнительная обработка суспензии сырье - экстрагент ультразвуком с удельной мощностью 39 Вт/л 5 минут.									

Пример 14. Производство средства «Экдистерон-80» осуществляют согласно примеру 1, но предварительно перед экстракцией растительное сырье смешивают с водой с удельным расходом 3,5 л/кг и нагревают до 100°С в микроволновой печи. Увлажненное и прогретое сырье трехкратно настаивают в 70% этаноле 2,5 ч. (первая экстракция) и по 1 часу вторая и третья стадии экстракции. Практический выход и состав средства отражены в табл. 1.

Удельный выход продукта по прототипу - 13,1-14,12 г/кг сырья, по предлагаемому способу - 13,4-14,16 г/кг сырья.

Установление биологической эффективности средства «Экдистерон-80» (исследования выполнены в отделе радиобиологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН): Средство добавляли в корм животным в концентрации действующего вещества (20-гидроксиэкдизона) 10 мг/кг живого веса в течение 1,5 месяцев. В эксперименте были задействованы самцы беспородных белых мышей по 25 экземпляров в каждом варианте (опыт, контроль). С начала эксперимента проводили регулярное взвешивание животных (через 2-3 дня). Генотоксичность средства оценена стандартными методами - оценка уровня микроядер в клетках костного мозга (МЯ); частота аномальных головок спермиев (АГС). К самцам через два месяца после начала кормления посажены интактные самки для

оценки доминантных летальных мутаций (ДЛМ), а также потенциальной и фактической плодовитости.

Сравнение скорости роста животных провели с учетом начального веса - минимального (18-23 г), среднего (24-25 г) и максимального (26-30 г). Показано, что средство оказывает стимулирующее действие на рост животных со «средним» начальным весом. Достоверно более высокий ( $p < 0,05$ ), чем в контроле, вес отмечен через 1,5 месяца.

В то же время введение в корм средства животным с минимальным и максимальным весом не оказывает стимулирующего влияния на увеличение массы тела. Наоборот, отмечается снижение скорости роста. Животные с малым весом, принимавшие средство, отставали в росте от контрольных особей.

Средство «Экдизон-80» не приводит к изменению митотической активности клеток костного мозга у беспородных мышей. Обнаружено уменьшение уровня микроядер у животных, употреблявших «Экдистерон-80» ( $p < 0,001$ ). Через две недели после прекращения кормления разницы по частоте микроядер между контрольной группой и «экдистероном-80» не наблюдается.

При оценке частоты аномальных головок спермиев у мышей сразу после окончания кормления пищевыми добавками выявлено, что группа «Экдистерон-80» имеет одинаковую с контролем частоту АТС. Через две недели после прекращения приема средства уровень АГС превышает контрольные значения.

Выявлено достоверное ( $p < 0,01$ ) увеличение доимплантационной гибели эмбрионов в потомстве животных, получавших средство. Достоверных отличий в частоте постимплантационной гибели и общей эмбриональной смертности в опытной группе по сравнению с контролем не обнаружено. В группе животных, получавших указанное средство, выявлен достоверно низкий уровень фертильности самцов (40,0%) по сравнению с самцами контрольной группы (65,0%).

Установлено, эффективность средства «Экдистерон-80» может быть модифицирована генотипом особи и особенно полом. Показано, что средство проявляет гормональную активность в организме млекопитающих, выявлен анаболический эффект, однако эстрогенный эффект не обнаружен. Для мышей линии С57В1 показан антимуагенный эффект для соматических клеток. Выявлен мутагенный эффект исследуемого средства для мышей линии СВА. Показано, что длительное введение препарата практически не сказывается на величине негативных отдаленных эффектов.

Испытания активности средства «Экдистерон-80» проведены методом биологического тестирования на лабораторных белых беспородных крысах на кафедре фармакологии Ярославской государственной медицинской академии. В опытах было использовано 168 крыс массой тела 180-200 г. Исследуемое средство вводили крысам перорально в дозе 20 мг/кг однократно или в течение 30 дней. Контрольные животные получали вместо средства дистиллированную воду. Опыты проводились в соответствии с действующими "Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных" [Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // Хроника ВОЗ. - 1985. - Т.39. - N3. - С.3-96].

Для исследования адаптогенных свойств средства использовался трехэтапный скрининг [Федоров В.Н. Фармакодинамика адаптогенов: экспериментальное и клиническое исследование, дисс. д-ра мед. наук. 1999; 231 с].

Антигипоксические свойства препарата исследовали на модели нормобарической нормакапнической гипоксической гипоксии, помещением крыс в гермокамеру объемом 1,5 литра. Сопrotивляемость организма к действию предельных мышечных нагрузок (актопротекторная активность) исследовали на модели принудительного плавания крыс с грузом 10% от массы тела до полного утомления. Стресс-синдром моделировали иммобилизацией крыс на спине в течение 24 часов.

Мышечные нагрузки в условиях гипоксии моделировались свободным плаванием крыс в гермокамере с объемом воздуха 1,5 л.

Термопротекторная активность. Острую гипотермию моделировали при свободном



плавании крыс в воде с температурой 10°C.

Острую гипертермию моделировали помещением животных в термокамеру с температурой 60°C.

Кардиопротекторная активность. Хроническая сердечная недостаточность по тотальному типу моделировалась введением крысам в обе плевральные полости по 2,5 мл силиконового масла [Пятницкий Н.Н., Блинков Ю.А. К вопросу о моделировании недостаточности правого сердца // Кардиология. - 1970. - №1. - С.143-144; Федоров В.Н., Яльцев А.В., Данилова О.В., Сидоров А.В., Катаев В.В. Динамическая модель тотальной хронической сердечной недостаточности у крыс // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2005. - №3. - С.7-9]. Применение средства начиналось через 1 месяц после первоначального введения масла. Определяли вес сердца и вычисляли весовые коэффициенты (вес сердца в мг/вес крысы в г). В крови и сердце флюорометрическим методом исследовали содержание катехоламинов (адреналин, норадреналин, дофамин), гистамина, серотонина и 11-оксикортикостероидов.

Продолжительность жизни крыс при нормобарической гипоксии (табл.2) при остром и курсовом введении исследуемого средства достоверно повышалась по сравнению с контролем на 19-24% (p<0,05). Продолжительность принудительного плавания крыс повышалось в большей степени однократное применение средства (почти в 3 раза, p<0,05), чем хроническое, при котором повышение работоспособности крыс возрастало примерно в 2 раза (p<0,05).

Группа	Продолжительность жизни при гипоксии (мин)	Продолжительность плавания (мин)
Контроль	55±2	18±1
«Экдистерон-80» - однократное введение	68±2*	53±10*
«Экдистерон-80» - 30-дневное введение	65±2*	35±5*

\*) - достоверная разница с контролем при p<0,05.

«Экдистерон-80» активно препятствовал стрессорной гипотрофии тимуса и гипертрофии надпочечников, причем более активно было хроническое введение средства (табл.3).

Группа	Весовые коэффициенты тимуса	Весовые коэффициенты надпочечников
Интakтные животные	1,22±0,11	0,086±0,008
Контроль	0,50±0,09	0,125±0,011
«Экдистерон80» - однократное введение	0,78±0,10	0,102±0,012
«Экдистерон80» - 30-дневное введение	1,15±0,15*	0,094±0,007*

\*) - достоверная разница с контролем при p<0,05

Группа	% крыс с язвами	степень изъязвления	индекс Паулса
Контроль	100	19,4±4,2	19,4
«Экдистерон-80» - однократное введение	80	6,4±2,2*	5,1*
«Экдистерон-80» - 30-дневное введение	80	2,1±0,9*	1,7*

\*) - достоверная разница с контролем при p<0,05.

Введение «Экдистерона-80» на фоне иммобилизационного стресса оказывало гастропротективное действие, также более значимое при хроническом использовании средства (табл.4).

Однократное и курсовое применение «Экдистерона-80» повышало (на 20-50%) сопротивляемость крыс к острой гипер- и гипотермии (табл.5).

Группа	Продолжительность жизни при гипертермии (мин)	Продолжительность плавания в условиях гипотермии (мин)
Контроль	12±1	10±1
«Экдистерон-80» - однократное введение	15±2	12±2

«Экдистерон-80» - 30-дневное введение	17±2	15±2
---------------------------------------	------	------

\*) - достоверная разница с контролем при p<0,05.

5 «Экдистерон-80» также увеличивал сопротивляемость организма (на 35-50%) и к условиям комбинированного воздействия (таблица 6), достоверно при курсовом введении.

Таблица 6  
Продолжительность плавания крыс в условии гипоксии (актопротекторная активность средства)

Группа	Продолжительность свободного плавания (мин)
Контроль	42±8
«Экдистерон-80» - однократное введение	57±4
«Экдистерон-80» - 30-дневное введение	63±5*

\* - достоверная разница по сравнению с контролем при p<0,05.

10

15 Анализируя данные, полученные в ходе трехэтапного скрининга средства «Экдистерон-80», можно утверждать, что исследуемый препарат обладает устойчивым адаптогенным действием.

Кардиопротективные свойства средства «Экдистерон-80»: Продолжительность эксперимента - 3 месяца. «Экдистерон-80» в дозе 20 мг/кг вводился животным внутривенно со второго месяца моделирования ХСН.

Таблица 7  
Смертность крыс с экспериментальной ХСН.

Группа	% смертности животных за 90 дней ХСН
Группа интактных	2,5%
Группа контроля	28,2%*
Группа «Экдистерон-80»	16,3%

\* - достоверная разница (p<0,05) с интактной группой  
\*\* - достоверная разница (p<0,05) с контрольной группой

20

25

В группе животных с экспериментальной ХСН без лечения на фоне выраженного нейрогормонального дисбаланса смертность животных достоверно увеличилась по сравнению с интактными с 2,5 до 28,2%. Введение средства «Экдистерон-80» приводило к снижению летальности в 1,7 раза (таблица 7).

30 При экспериментальной ХСН у крыс происходило достоверное увеличение весовых коэффициентов сердца на 10% по сравнению с интактной группой (табл.8).

Таблица 8  
Весовой коэффициент сердца у крыс с экспериментальной ХСН.

Группа	Весовой коэффициент сердца
Группа интактных	2,583±0,051
Группа контроля	2,830±0,048*
Группа «Экдистерон-80»	2,451±0,070**

\* - достоверная разница (p<0,05) с интактной группой  
\*\* - достоверная разница (p<0,05) с группой контроля

35

40 «Экдистерон-80» достоверно снижал значение весового коэффициента сердца по отношению к контролю - на 14%.

На фоне экспериментальной ХСН у крыс имело место выраженное нарушение обмена катехоламинов (табл.9): отмечалось значимое повышение концентрации АД и ДА в крови на 43 и 34% и снижения ее в сердце в 3,2 и 2,6 раза. Содержание ДА падало как в крови, так и сердце на 20%.

45

На фоне применения «Экдистерона-80» происходила практически полная нормализация содержания НА во всех изучаемых структурах организма крыс; в сердце по сравнению с контрольной группой повысилось содержания АД и ДА на 50 и 25% соответственно, а в крови уровни АД и ДА стали выше (на 58 и 23%), чем у интактных животных.

50

Таблица 9  
Влияние средства «Экдистерон-80» на содержание КА в крови крыс с ХСН.

Группа	АД	НА	ДА
Кровь (мкг/мл)			
Интактные	0,254±0,037	0,317±0,029	0,133±0,007
Группа контроля	0,371±0,064	0,433±0,033*	0,107±0,007*

Группа «Экдистерон-80»	0,408±0,025*	0,349±0,020**	0,165±0,017**
Сердце (мкг/г)			
Группа	АД	НА	ДА
Интактные	2,895±0,158	4,044±0,272	1,022±0,110
Группа контроля	0,908±0,037*	1,504±0,077*	0,376±0,033*
Группа «Экдистерон-80»	1,388±0,177**	4,187±0,435**	0,467±0,051*
* - достоверная разница (p<0,05) с интактной группой			
** - достоверная разница (p<0,05) с контрольной группой			

5

Таким образом, при использовании средства «Экдистерон-80» в терапии ХСН в крови снижается количество вазоспастического катехоламина - НА на фоне повышения концентрации АД и ДА, оказывающих вазодилатирующее действие, что приводит к снижению постнагрузки и облегчению работы сердца.

10

В крови больных крыс содержание 11-ОКС достоверно увеличилось почти в 3 раза (табл. 10). «Экдистерон-80» препятствовал нарастанию содержания 11-ОКС в крови больных крыс.

15

Таблица 10 Содержание 11-ОКС в крови крыс с экспериментальной ХСН.	
Группа	11-ОКС (мкг/мл)
Интактные	0,60±0,05
Группа контроля	1,72±0,45*
Группа «Экдистерон-80»	1,15±0,14*
* - достоверная разница (p<0,05) с интактной группой	
** - достоверная разница (p<0,05) с контрольной группой	

20

Таблица 11 Содержание ГТ и СТ в крови и сердце крыс с экспериментальной ХСН.		
Группа	ГТ	СТ
Кровь (мкг/мл)		
Интактные	0,073±0,005	0,156±0,036
Группа контроля	0,099±0,009*	0,183±0,015
Группа «Экдистерон-80»	0,096±0,005*	0,144±0,026
Сердце (мкг/г)		
Интактные	0,378±0,044	0,345±0,030
Группа контроля	0,605±0,045*	0,508±0,065*
Группа «Экдистерон-80»	0,440±0,042**	0,276±0,022**
* - достоверная разница (p<0,05) с интактной группой		
** - достоверная разница (p<0,05) с контрольной группой		

25

30

У больных животных при экспериментальной ХСН (табл. 11) отмечалось повышение в крови и сердце концентрации ГТ и СТ на 33 и 18% и в сердце - на 58 и 56% соответственно. При введении средства «Экдистерон-80» имело место нормализация уровня СТ во всех исследуемых структурах, а ГТ - в сердце. В крови уровень ГТ оставался умеренно повышенным. Таким образом, средство оказывает благоприятное действие на соотношение активности внутрисосудистых вазоконстрикторов/вазодилататоров.

35

40

Таким образом, средство «Экдистерон-80» обладает выраженной стресспротекторной активностью, проявляющейся в уменьшении повреждающего воздействия стресса на чувствительные ткани, что связано с нормализующим влиянием средства на гормонально-медиаторный баланс организма.

45

Для осуществления предлагаемого способа производства средства «Экдистерон-80» необходимо затратить от 18,5 до 41,5 ч в зависимости от выбранного варианта экстракции сырья. Наиболее значимое сокращение затрат времени достигнуто на стадии хроматографического обогащения экдистероидов за счет применения жидкостной флэш-хроматографии. Если вариант колоночной жидкостной хроматографии для концентрирования экдистероидов по прототипу требует затрат не менее 12 часов рабочего времени, то метод флэш-хроматографии - не более 2 ч с одинаковым выходом конечного продукта. Достигнуто упрощение способа по сравнению с прототипом за счет исключения

50

стадии электрохимической коагуляции фенольных соединений и белков из экстрактов растения, также исключения стадии рекстракции гидрофобных сопутствующих веществ из осветленного экстракта петролейным эфиром.

5 Таким образом, предлагаемый способ упрощает технологию получения средства «Экдистерон-80», повышает вариабельность технологического оформления способа за  
 10 счет увеличения альтернативных вариантов осуществления экстракции сырья. Средство «Экдистерон-80» расширяет арсенал средств, обладающих кардиопротекторным, антигипоксическим, гастропротекторным и адаптогенным действием, термопротекторной актопротекторной и анаболической активностью, повышает медико-биологической ценности средств, содержащих экдистероды растений.

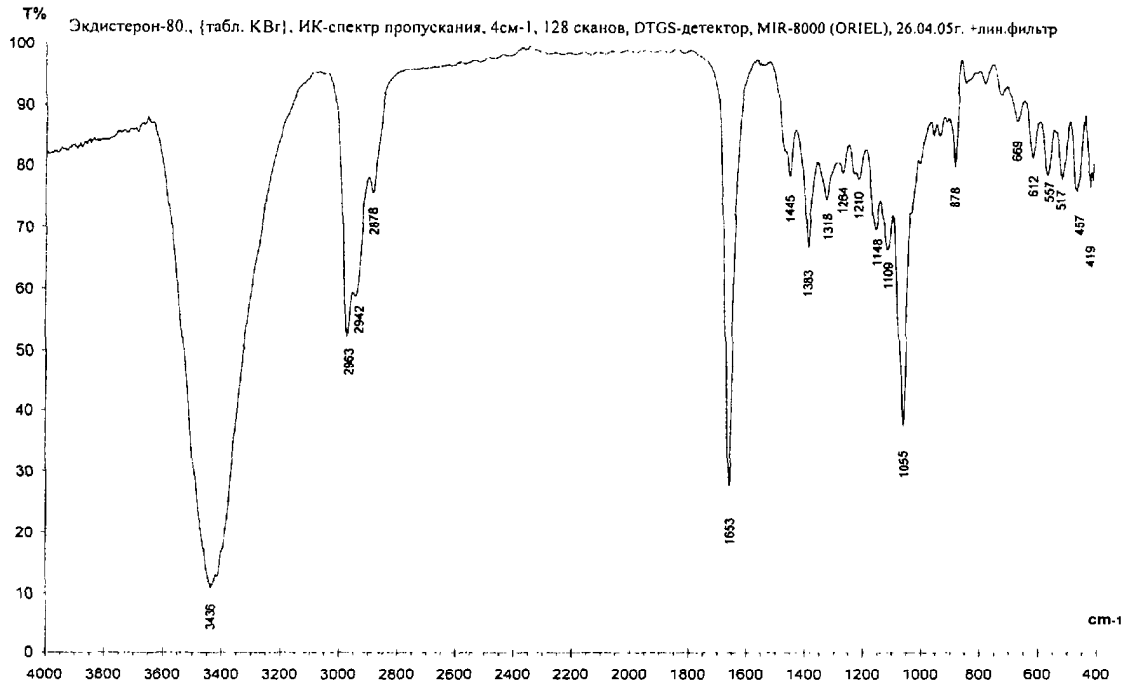
#### Формула изобретения

1. Применение суммы фитоэкдистероидов, включающей не менее 80% 20-гидроксиэкдизона, 8-11% 25S-инокостерона и 5,9-9,8%  $\alpha$ -экдизона, полученной из  
 15 надземной массы растения *Serratula coronata* L., собранной в фазу вегетации или массовой бутонизации до начала цветения, в качестве кардиопротекторного, адаптогенного, антигипоксического, гастропротекторного, термопротекторного, анаболического и актопротекторного средства.

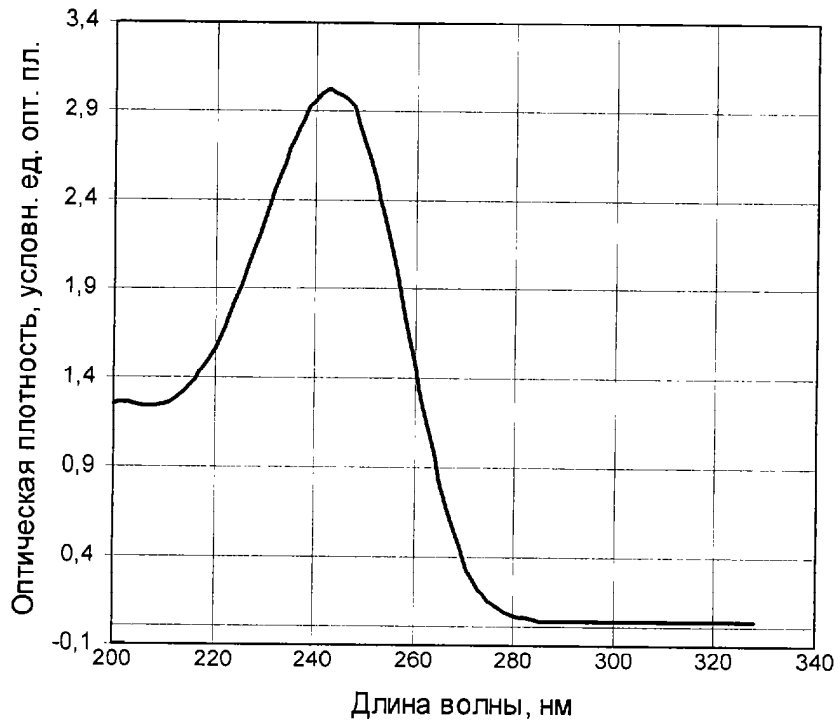
2. Способ производства средства, представляющего собой сумму фитоэкдистероидов,  
 20 включающий измельчение надземной массы растения *Serratula coronata* L., собранной в фазу массовой бутонизации до начала цветения, экстракцию смесью вода-этанол, отделение экстракта, вакуумное концентрирование, осветление фильтрованием через сорбент, элюирование фитоэкдистероидов с сорбента, объединение фракций, перекристаллизацию фитоэкдистероидов и сушку готового продукта, отличающийся тем,  
 25 что растительное сырье перед экстракцией настаиванием предварительно обрабатывают кипящей водой с удельным расходом 2,6 л/кг сырья в течение 20 мин или обрабатывают водяным паром с температурой 100°C с удельным расходом 0,03-0,09 кг/кг в течение 1-3 мин или смешивают с водой с удельным расходом 3,5 л/кг и прогревают в микроволновой печи до 100°C, суспензию экстрагент-сырье обрабатывают ультразвуком с удельной  
 30 мощностью 39 Вт/л в течение 5 мин, последовательно трехкратно экстрагируют настаиванием 70-96% этанолом при гидромодуле процесса 1:(9-15) в течение 4,5-36 ч, отделяют экстракт фильтрованием и концентрируют в вакууме при температуре не более 50°C, затем экстракт осветляют фильтрованием через сорбент формулы  $M_xO_y$ , (где M=Si или Mg или Al, x=1 или 2, y=1-3) или смесью указанных сорбентов, осветленный экстракт  
 35 подвергают преципитации на оксид алюминия при соотношении сухой остаток-сорбент 1:9 с последующей сушкой в вакууме, далее преципитат помещают в колонку для флэш-хроматографии поверх оксида алюминия дисперсности 40-80 мкм и элюируют фитоэкдистероиды смесью этилацетат-этанол с градиентом концентрации этанола от 0 до 96%, перекристаллизацию фитоэкдистероидов осуществляют двукратно из смеси  
 40 этилацетат-этанол и однократно из безводного этанола с охлаждением до -72°C с промежуточным фильтрованием.

45

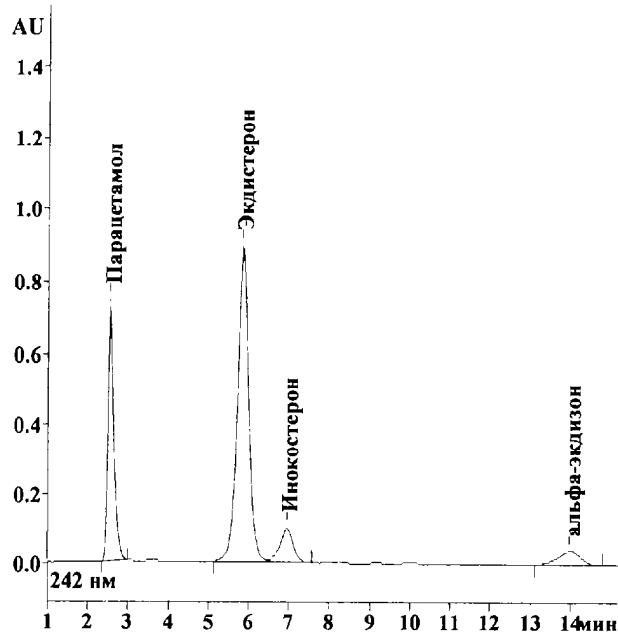
50



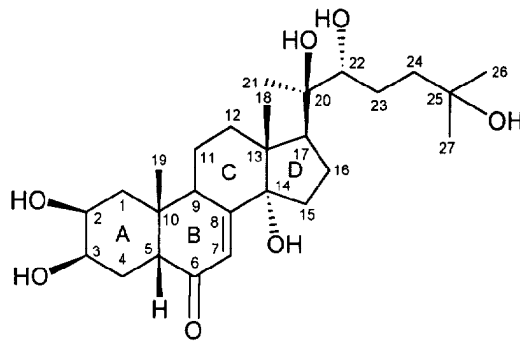
Фиг. 1



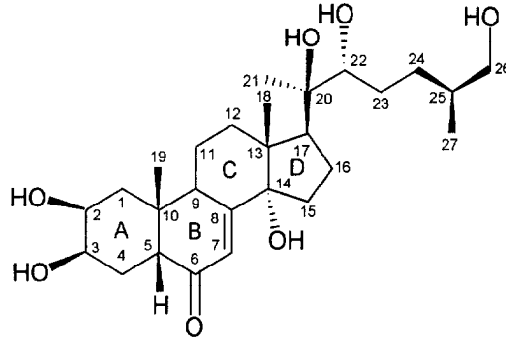
Фиг. 2



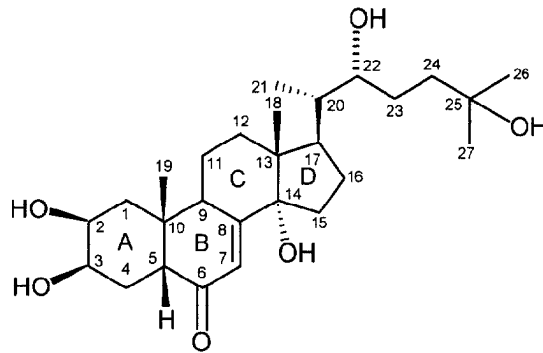
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6