



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 104 027** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) МПК<sup>6</sup> **A 61 K 35/78**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96117773/14, 04.09.1996

(46) Дата публикации: 10.02.1998

(56) Ссылки: 1. RU, патент, 1510147, кл. А 61 К 35/78, 1987. 2. RU, патент, 2032419, кл. А 61 К 35/78, 1993.

(71) Заявитель:

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН

(72) Изобретатель: Максимов О.Б.,

Кулеш Н.И., Федорев С.А., Глебко

Л.И., Покушалова Т.В., Степаненко

Л.С., Кривощекова О.Е., Горовой

П.Г., Саратиков А.С., Чучалин В.С., Власова

Т.В.

(73) Патентообладатель:

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ, ОБЛАДАЮЩИХ ГЕПАТОЗАЩИТНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

(57) Реферат:

Способ предназначен для получения растительных полифенолов, обладающих гепатозащитным действием. Измельченную ядровую древесину мааки амурской

экстрагируют 95%-ным спиртом при 50-55°C в соотношении сырье: экстрагент 1:5 в батарее перколяторов, затем спиртовые извлечения упаривают и сушат в вакууме. 3 табл.

RU 2 104 027 C1

RU 2 104 027 C1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 104 027** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> **A 61 K 35/78**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 96117773/14, 04.09.1996

(46) Date of publication: 10.02.1998

(71) Applicant:  
Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj  
khimii DVO RAN

(72) Inventor: Maksimov O.B.,  
Kulesh N.I., Fedoreev S.A., Glebko  
L.I., Pokushalova T.V., Stepanenko  
L.S., Krivoshchekova O.E., Gorovoj  
P.G., Saratikov A.S., Chuchalin V.S., Vlasova  
T.V.

(73) Proprietor:  
Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj  
khimii DVO RAN

(54) **METHOD OF PREPARING VEGETABLE POLYPHENOLS SHOWING HEPATOPROTECTIVE EFFECT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, phytotherapy.  
SUBSTANCE: maakia Amur milled core wood is  
extracted with 96% ethanol at 50-55 C at  
ratio raw : extract = 1:5 in battery of

percolators. Then alcoholic extracts were  
evaporated and dried under vacuum. The end  
product can be used in medicine since it  
shows hepatoprotective effect. EFFECT:  
improved method of preparing. 3 tbl

RU  
2 104 027  
C 1

RU  
2 104 027  
C 1

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и может быть использовано для получения растительных полифенолов, обладающих гепатозащитным действием. Кроме гепатозащитного, полифенолы обладают желчегонным действием и способны понижать содержание билирубина в крови больных вирусным гепатитом.

Известен способ получения гепатозащитного препарата силибора, заключающийся в экстракции семян расторопши пятнистой 80%-ным спиртом с последующим упариванием и растворением остатка 50%-ным метанолом. Раствор обрабатывают четыреххлористым углеродом, затем смесью хлороформэтанол. Органическую фазу упаривают, сушат и получают целевой продукт с выходом 4,5-5,0% по сырью [1]. Однако данный способ предполагает использование высокотоксичных растворителей, а получаемый продукт значительно уступает по ряду фармакологических показателей препарату, получаемому по заявленному способу [2,3].

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому результату является способ получения растительных полифенолов, обладающих гепатозащитным действием, из ядровой древесины мааки амурской [4]. Согласно известному способу сырье экстрагируют 95%-ным спиртом при 50-55°C в соотношении сырье : экстрагент - 1 : 5, трехкратным настаиванием в течение трех суток (24•3 ч), остаток после упаривания объединенного экстракта разбавляют водой и очищают тяжелым петролейным эфиром или хлористым метиленом в соотношении водный остаток : растворитель 3-4:1, а целевой продукт экстрагируют этилацетатом или бутанолом.

К недостаткам известного способа, выявленным при его многократном осуществлении, относятся следующие.

Требуется глубокая отгонка спирта от первичных суммарных экстрактов для успешного проведения экстрагирования малополярным растворителем (удаление липидов) и, особенно, этилацетатом (получение целевого продукта), чтобы отделение растворителя от водной фазы происходило полно и экстракция проходила эффективно. Практическое же осуществление способа показало, что при глубокой отгонке спирта часть активных полифенолов мааки амурской выпадает в осадок, загрязняет дистилляционную аппаратуру и требует периодической ее очистки, что связано с потерей части целевого продукта, дополнительным расходом спирта и простым аппаратуры. Использование хлористого метилена (и других хлорированных растворителей с удельным весом более 1) также при этом становится невозможным из-за образования неразделимых суспензий этого тяжелого растворителя с выпавшим осадком. Применение же петролейного эфира - легко воспламеняющегося и взрывоопасного растворителя, требует создания специальных технологических условий и мер по обеспечению пожарной безопасности, что вызывает значительное удорожание целевого продукта. Далее, получение целевого продукта из освобожденных от липидов

водно-спиртовых растворов достигается экстрагированием его этилацетатом, также пожароопасным при его использовании и регенерации. Отгонка этого растворителя от полифенолов мааки сопровождается выпадением части их в осадок, бурным вскипанием растворителя и перебросами, что в высшей степени затрудняет осуществление данной операции.

Задача изобретения - простым и экономичным способом получить препарат, обладающий равным гепатозащитным действием при наличии дополнительных форм фармакологической активности.

Задача решена тем, что в способе получения растительных полифенолов, обладающих гепатозащитным действием, путем экстракции измельченной ядровой древесины мааки амурской 95%-ным спиртом при 50-55°C в соотношении сырье: экстракт - 1:5 и выделения целевого продукта, экстракцию осуществляют в батарее перколяторов, затем спиртовое извлечение упаривают и сушат в вакууме.

Заявляемый способ обладает следующими преимуществами перед известными: во-первых, он более экономичный, так как экстрагирование сырья в батарее перколяторов требует меньшего расхода растворителя и энергетических затрат; во-вторых, он более простой, так как не производится очистка спиртового извлечения малополярными растворителями от примесей липидов, а также освобождение целевых веществ от водорастворимых компонентов путем экстракции этилацетатом; в-третьих, дополнительными фармакологическими и клиническими испытаниями у полученного предлагаемым способом суммарного извлечения обнаружено желчегонное действие, а также способность понижать уровень билирубина в крови больных, перенесших вирусный гепатит.

Возможность использования в качестве гепатозащитного средства суммарного спиртового извлечения не могла предвидеться заранее и требовала специальных доказательств. Известны многочисленные способы получения из растительного сырья полифенолов подобного типа действия. Однако, наличие в растительном материале как малополярных (липиды, смолы, воски, стерины), так и полярных нефенольных компонентов (алкалоиды, сапонины), соизвлекаемых вместе с полифенолами спиртом или ацетоном, приводит к необходимости усложнять технологический процесс. Неполярные компоненты, не обладая выраженным гепатозащитным действием, и присутствие в сырье в значительных количествах, могут разубоживать активные части экстракта, снижая его фармакологическую активность. Липидные компоненты растений обычно содержат полиненасыщенные жирные кислоты и глицериды, их включение в целевой продукт может вызвать понижение его стабильности из-за склонности таких липидов к перекисидации. Среди водорастворимых полярных компонентов, соизвлекаемых с полифенолами спиртом, часто оказываются токсические примеси (например, алкалоиды), из-за чего полифенольный целевой продукт селективно экстрагируют из раствора

подходящим органическим растворителем, не смешивающимся с водным спиртом.

Учитывая все вышеизложенное, сравнительному фармакологическому исследованию были подвергнуты два препарата: сумма полифенолов, полученная из ядровой древесины маакии амурской в точном соотношении со способом-прототипом, и суммарное спиртовое извлечение, полученное по заявленному способу, т.е. без последующего сольвентного фракционирования. Результаты представлены в табл. 1. Как видно из табл. 1, по всем важнейшим показателям, характеризующим биологическую активность, различий между этими двумя препаратами не наблюдалось.

Для установления стабильности (сроков годности) оба препарата были заложены на хранение в условиях, предусмотренных Государственной Фармакологией. Через промежутки времени в них методом ВЭЖХ [5] устанавливалось количественное содержание важнейших компонентов, определяющих гепатозащитную активность. Результаты представлены в табл.2. Эти опыты также показали отсутствие каких-либо отличий в стабильности препаратов.

Таким образом было подтверждено, что специальное удаление липидных и водорастворимых компонентов экстрактов ядровой древесины маакии амурской, в отличие от экстрактов из травянистого лекарственного сырья, не повышает заметным образом гепатозащитного действия полифенольного комплекса и не отражается на биологической активности и токсичности целевого продукта.

Экспериментально установлено наличие у спиртового извлечения, полученного заявленным способом, нового ценного фармакологического свойства - активного желчегонного действия. Показатели представлены в табл. 3.

Ограниченные клинические испытания на больных добровольцах, страдающих вирусным гепатитом с устойчивым повышенным уровнем билирубина в крови, выявили способность нового препарата быстро снижать этот уровень до нормы.

Пример.

В батарею перколяторов, обогреваемых паровой рубашкой до 50°C, загружают растительное сырье (щепу ядровой древесины маакии) в количестве 10 кг в каждый аппарат. В первый заливают 110 л 95%-ного спирта\* (\*При запуске процесса завышенный объем спирта необходим для пропитывания первых порций сырья). После 24 ч настаивания экстракт в количестве около 90 л перекачивают во второй перколятор, а в первый заливают свежий растворитель (70 л). Спустя 24 ч экстракт из второго перколятора перекачивают в третий, а из первого - во второй. В первый перколятор вновь заливают 70 л спирта. Далее, через сутки, т. е. на четвертый день с начала процесса, экстракт из третьего перколятора (50 л) сливают и после фильтрации направляют на вакуум-упаривание для получения целевого продукта, а в него перекачивают экстракт из второго аппарата, а в тот - из первого. Содержимое первого перколятора полностью проэкстрагировано, но удерживает около 20 л растворителя (величина, зависящая от

размеров аппарата и степени дробления сырья). С помощью коммуникации его подключают к вакуум-выпарному устройству, поднимают температуру в рубашке до 70-80 °С до полной отгонки спирта, после чего аппарат разгружают и заполняют свежим сырьем.

Сливают экстракт (70л) из третьего перколятора в новый (им может быть подготовленный первый), а в него перекачивают экстракт из второго, после чего содержимое его освобождается от спирта, как указано выше. На шестые сутки из четвертого перколятора сливают 50 л готового экстракта, а в него заливают экстракт из третьего, подлежащего разгрузке. С этой стадии процесс входит в нормальный режим, при котором на каждом этапе заливается не завышенное количество спирта, как при запуске, а лишь по 70 л в перколятор. Через день производится слив очередной порции готового экстракта (50 л) и через день же - разгрузка очередного перколятора.

Таким образом, для полного извлечения сырья по предлагаемому способу расходуется 7-кратное количество спирта (л/кг), из которых 2-х кратное количество регенерируется из проэкстрагированного сырья. В работе постоянно находятся три перколятора, один из которых через день разгружается и загружается свежим сырьем.

Экстракт упаривают и сушат в вакууме в особом режиме.

При четырехкратном повторении способа выход целевого продукта составил (для одной и той же партии сырья), %: 5,6, 5,62, 5,67 и 5,64.

В способе прототипе расход растворителя составляет 17 л/кг, из которых около 2 л остается в сырье и подлежит регенерации, а 15 л поступает на упаривание для получения целевого продукта. Выход последнего составляет 6,0% от сухого сырья при содержании экстрагируемых веществ в сырье - 6,16%. Несколько пониженный выход целевого продукта при извлечении сырья в перколяторах (5,6% против 6,0%) объясняется тем, что растворитель (спирт), проходя последовательно через три перколятора несколько разбавляется влагой и вследствие этого не полностью извлекает липидные компоненты, содержащиеся в сырье. Эти компоненты в целевом продукте являются балластом и, как предусмотрено в способе-прототипе, специально удаляются из экстракта малополярным растворителем. Поэтому понижение выхода за счет не извлечения липидов следует рассматривать как положительную особенность заявленного способа.

Источники информации:

1. Авторское свидетельство, N 603382, кл. А 61 К 35/78, 1978.
2. Эксперим. и клин. фармакол. 1993, 56, N 5, 47-49.
3. Хим. фарм. журнал, 1996, N 2, 3-4.
4. Патент N 1510147, кл. А 61 К 35/78, 1987.
5. Хим. прир. соед. 1988, N 6, 801-804.

#### Формула изобретения:

Способ получения растительных полифенолов, обладающих гепатозащитным действием, путем экстракции измельченной ядровой древесины маакии амурской 95% -ным спиртом при 50 55°C в соотношении

сырье экстрагент 1 5 и выделения целевого продукта, отличающийся тем, что экстракцию осуществляют в батарее перколяторов, затем

спиртовое извлечение упаривают и сушат в вакууме.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

-5-

RU 2104027 C1

RU 2104027 C1

**ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ МААКИИ И СИЛИБОРА НА  
СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ  
ПЕЧЕНИ ПРИ CCl<sub>4</sub> - ГЕПАТИТЕ.**

Показатель	Интakтные животные	CCl <sub>4</sub> -гепатит	CCl <sub>4</sub> + спиртовое извлечение	CCl <sub>4</sub> + полифенольная фракция	CCl <sub>4</sub> + силибор*
Ретенция БСФ, %, 15 мин	5,8	39,4	5,9	6,1	7,0
Общий билирубин	9,2	33,9	11,9	12,3	14,6
Свободный билирубин	2,7	22,9	2,6	3,4	4,4
Щелочная фосфатаза мкмоль/л/час	9,2	21,9	8,0	8,2	10,8
АЛТ, мкмоль/л/час	1,72	5,55	1,53	1,77	5,10
АСТ, мкмоль/л/час	2,20	6,85	2,31	2,42	5,37
Дисновые конъюгаты/мг липидов	0,62	1,14	0,71	0,78	0,81
МДА, мкмоль/мг белка/мин (аскорбатзависимый)	0,26	1,40	0,34	0,33	0,69
МДА, мкмоль/мг белка/мин (НАДФ-Н <sup>+</sup> -зависимый)	0,37	2,86	0,39	0,44	1,01
Общие липиды в сыворотке крови, г/л	2,89	6,20	2,41	2,65	5,06

Примечания: БСФ - бромсульфадеин  
АЛТ - аланинаминотрансфераза  
АСТ - аспаратаминотрансфераза  
МДА - малоновый диальдегид

\* Данные, представленные в таблице 1, указывают, на то, что препарат, полученный заявленным способом (спиртовое извлечение) не уступает, а по некоторым показателям превосходит известный гепатозащитный препарат силибор.

Таблица 2

**СТАБИЛЬНОСТЬ СОСТАВА СУБСТАНЦИИ  
ГЕПАТОЗАЩИТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ МААКИИ АМУРСКОЙ**  
(Изготовлены Тихоокеанским институтом биоорганической химии ДВО РАН)

Материал	№ серии	Дата анализа	Содержание в %		Заключение
			изофлавонов	полигидрокси стильбенов	
Полифенольная фракция спиртового экстракта. Получена по способу прототипу	160890	III-91 г.	11,79	6,43	Удовлетворяет требованиям ВФС
		X-91 г.	11,88	6,61	
		IV-92 г.	11,81	6,63	
		X-92 г.	12,23	7,59	
	020890	II-91 г.	10,25	11,30	тоже
		IX-91 г.	10,34	12,96	
		IV-92 г.	10,04	12,17	
		X-92 г.	10,31	12,25	
	061190	V-91 г.	10,49	11,81	тоже
		XI-91 г.	10,45	13,17	
		V-92 г.	10,49	12,06	
		II-92 г.	9,95	12,60	
	151190	V-91 г.	10,32	10,24	тоже
		XI-91 г.	10,89	10,55	
		V-92 г.	10,32	10,28	
		II-92 г.	10,16	11,35	
Спиртовый экстракт. Получен по заявляемому способу	200692	VI-92 г.	9,58	11,76	тоже
		I-93 г.	9,50	10,65	
		II-93 г.	9,64	11,81	
		XII-93 г.	9,54	11,61	
	250692	VI-92 г.	10,59	7,40	тоже
		I-93 г.	10,91	7,47	
		VII-93 г.	10,46	7,50	
		XII-93 г.	10,86	7,63	
	070792	VII-92 г.	10,49	6,65	тоже
		II-93 г.	10,14	6,67	
		VII-93 г.	11,68	6,50	
		I-94 г.	11,58	6,80	
	200792	VII-92 г.	8,52	7,73	тоже
		I-93 г.	9,18	7,83	
		VII-93 г.	9,22	8,07	
		I-94 г.	9,02	8,17	

Требования ВФС: Изофлавонов - не менее 8,0%  
Полигидрокси-стильбенов - не менее 6,0%

Таблица 3

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ МААКИИ АМУРСКОЙ И СИЛИБОРА  
НА ПОКАЗАТЕЛИ ЖЕЛЧЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ  
ИНТАКТНЫХ КРЫС И ПРИ CCl<sub>4</sub>-ГЕПАТИТЕ**

Условия эксперимента	Скорость сек- реции желчи, г/кг веса	Количество ингредиентов желчи за 4 ч		
		билирубин	холестерин	желчные кислоты
Интактные животные	1,8	0,56	0,61	43,3
Однократное введение препаратов: полифенолы маакии силибор	2,6	0,88	1,03	75,1
	2,5	0,69	0,68	44,6
Курсовое введение препаратов: полифенолы маакии силибор	4,1	1,45	2,82	86,7
	3,3	0,98	0,87	56,5
CCl <sub>4</sub> -гепатит: полифенолы маакии +CCl <sub>4</sub> силибор+CCl <sub>4</sub>	3,1	1,44	2,45	36,3
	2,7	1,12	0,66	21,7

RU 2104027 C1

RU 2104027 C1