

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042579**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.01

(51) Int. Cl. **C07H 13/08 (2006.01)**
C07H 1/08 (2006.01)

(21) Номер заявки
202290221

(22) Дата подачи заявки
2020.03.30

(54) **СПОСОБ ОЧИСТКИ ПУНИКАЛАГИНА, ОСНОВАННЫЙ НА ОСОБЕННОСТЯХ
ИЗОМЕРИЗАЦИИ**

(31) **201910711349.9**

(56) CN-A-101955500
CN-A-108864217
CN-A-106349301
CN-A-110357933

(32) **2019.08.02**

(33) **CN**

(43) **2022.04.07**

(86) **PCT/CN2020/082035**

(87) **WO 2021/022819 2021.02.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**СИНЬЦЗЯН ТЕХНИКАЛ
ИНСТИТУТ ОФ ФИЗИКС ЭНД
КЕМИСТРИ, ЧАЙНИЗ ЭКЭДЕМИ
ОФ САЙЕНСИЗ (CN)**

(72) Изобретатель:
**Айса Хацзи Акбер, Сунь Гуанин,
Чжао Юнсинь, Абудуайни Мунир,
Адили Гуликир (CN)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) Изобретение относится к способу очистки пуникалагина, основанному на особенностях изомеризации, и его получению, где экстракт кожуры граната используется в качестве сырья. Данный способ позволяет избежать примесей, содержащихся в пуникалагине, что основано на структурных характеристиках, т.е. пуникалагин в экстракте кожуры граната находится в виде двух взаимнопревращаемых изомеров. В данном способе препаративная жидкостная хроматография в полупромышленном масштабе используется для получения большого количества пуникалагина, характеризующегося чистотой выше 98%, из сложного экстракта кожуры граната. Способ является очень простым, полученный пуникалагин характеризуется высокой степенью чистоты, а его производство проводится в больших масштабах. Он имеет сильную эталонную ценность для очистки и получения соединений с особенностями изомеризации.

042579
B1

042579
B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет заявки на патент Китая № 201910711349.9, поданной 2 августа 2019 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к способу очистки пуникалагина, основанному на особенностях изомеризации.

Предпосылки создания изобретения

Получение большого количества мономерных соединений высокой чистоты из сложных натуральных лекарственных материалов или экстрактов всегда было актуальной и сложной задачей. Натуральные продукты имеют много компонентов и очень сложный структурный состав. Одно соединение часто соседствует с соединениями с очень похожими структурами, что вызывает чрезвычайно серьезные препятствия для отделения целевого соединения. Эти препятствия часто называют матричным эффектом. В традиционной колоночной хроматографии, жидкостной хроматографии и противоточной хроматографии этот матричный эффект часто вызывает значительные трудности при разделении чистых соединений или даже приводит к невозможности получения продуктов с требуемой чистотой. Поэтому очень важно изобрести способ разделения, который может эффективно избежать матричного эффекта и может быть применен к простым способам хроматографического разделения, чтобы повысить эффективность очистки мономерных соединений из натуральных продуктов.

Изомеры, которые широко встречаются в натуральных продуктах, представляют собой соединения с одинаковой молекулярной массой, но разной структурой. Существует много видов изомеров, и некоторые из них имеют особую структуру, например определенные эпимеры и цис-транс-изомеры, которые могут быть преобразованы друг в друга при определенных условиях. В настоящее время были проведены достаточно обдуманные и интенсивные исследования касательно данной реакции изомеризации. Однако внедрение этой особенности изомеризации в область разделения и очистки для решения проблемы матричного эффекта при очистке изомеризуемых соединений является совершенно новой концепцией и о ней до сих пор не сообщалось в каком-либо литературном источнике. Такой способ можно назвать способом очистки на основе изомеризации.

Основной принцип способа очистки на основе изомеризации заключается в том, что изомеризуемое соединение обычно показывает два или более пика на хроматограмме. Компонент, содержащий один из изомеров и совместно элюируемые примеси, собирают с хроматографии и быстро превращают в компонент, содержащий все изомеры при определенных условиях (одномерное разделение). Когда компонент анализируют с помощью жидкостной хроматографии, на хроматограмме представлены пики всех изомеров. Компонент вторично очищается тем же способом, что и при одномерном разделении. Все изомерные компоненты, кроме компонента исходного изомера, собираются селективно, что позволяет эффективно избежать примесей, включенных в исходный изомер. Затем при определенных условиях полученные компоненты превращаются в смесь всех изомеров без примесей.

Пуникалагин представляет собой разновидность растительного полифенола с эллаговой кислотой в качестве материнского ядра и им богаты лекарственные вещества из кожуры граната, при этом он демонстрирует различные биологические свойства противовоспалительного, антибактериального, противовирусного действия, предотвращая пролиферацию раковых клеток, что делает его потенциальным соединением для лекарственных средств. В структуре пуникалагина присутствует глюкозид с одним концевым углеродом, что может вызывать образование двух аномеров, а именно α -пуникалагина и β -пуникалагина. Два изомера пуникалагина могут взаимно превращаться при хроматографии. В настоящее время очистка пуникалагина в основном полагается на способы, основанные на колоночной хроматографии, жидкостной хроматографии и противоточной хроматографии, а также на их комбинации. Поскольку матричный эффект в натуральных продуктах очень сложен, очистка пуникалагина очень трудна, пуникалагин высокой чистоты может быть получен в небольшом количестве или даже невозможно получить пуникалагин чрезвычайно высокой чистоты. Используя характеристики изомеризации пуникалагина, разработан способ очистки, основанный на особенностях изомеризации. Путем применения хроматографии в полупромышленном масштабе большие количества пуникалагина высокой чистоты получали с помощью способа очистки, основанного на особенностях. Ключевым моментом настоящего изобретения является разработка способа очистки, основанного на особенностях изомеризации, и его применение в периодическом получении пуникалагина высокой чистоты, что имеет большое значение для исследования и разработки новых лекарственных средств на основе пуникалагина. Способ очистки, основанный на особенностях изомеризации, является подходящим для очистки изомеризуемых соединений, что является новаторским и показательным.

Сущность изобретения

Целью настоящего изобретения является предоставление способа очистки пуникалагина, основанного на особенностях изомеризации. Используя характеристики изомеризации пуникалагина, примеси, элюированные вместе с пуникалагином в экстракте кожуры граната, могут быть эффективно удалены с помощью способа, основанного на особенностях изомеризации. Используя препаративную жидкостную хроматографию в полупромышленном масштабе несколько грамм пуникалагина с чистотой выше 98%

получали из сложного экстракта кожуры граната. Способ является простым, эффективным и экономичным, что является ценным для очистки и получения соединений с характеристиками изомеризации.

Способ очистки пуникалагина, основанный на особенностях изомеризации, по настоящему изобретению включает следующие стадии:

а) отбор хроматографической колонки с обращенной фазой, где подвижная фаза состоит из метанола и 0,01-5% (об./об.) водного раствора муравьиной кислоты в объемном соотношении 1-5:9-5, скорость потока контролируют на уровне 50-300 мл/мин и длина волны УФ-детектирования составляет 220-280 и 350-380 нм, колонку уравнивают подвижной фазой в течение 3-30 мин перед применением;

б) взвешивание экстракта кожуры граната, растворение его в воде, отбор надосадочной жидкости после центрифугирования и загрузка его в хроматографическую колонку с обращенной фазой, сбор по отдельности двух компонентов, примерно соответствующих пикам α -пуникалагина и β -пуникалагина, затем концентрирование с помощью роторного испарителя при 30-50°C;

в) повторная загрузка концентрированного собранного компонента, соответствующего пику α -пуникалагина, полученного на стадии б), в хроматографическую колонку с обращенной фазой для разделения в тех же условиях, что и на стадии а), и сбор двух компонентов, соответствующих хроматографическим пикам α -пуникалагина и β -пуикалагина соответственно, где собранный компонент, примерно соответствующий пику β -пуикалагина, концентрируют с помощью роторного испарителя при температуре 30-50°C и лиофилизируют в виде порошка пуникалагина с чистотой выше 98%, как определено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии; собранный компонент, примерно соответствующий пику α -пуикалагина, концентрируют с помощью роторного испарителя при температуре 30-50°C и повторно разделяют в тех же хроматографических условиях, что и на стадии а), с получением пуникалагина высокой чистоты; и/или

повторная загрузка концентрированного собранного компонента, примерно соответствующего пику β -пуикалагина, полученного на стадии б), в хроматографическую колонку с обращенной фазой в тех же условиях, что и на стадии а), и сбор двух компонентов, примерно соответствующих пикам α -пуикалагина и β -пуикалагина, где собранный компонент, примерно соответствующий α -пуикалагину, концентрируют с помощью роторного испарителя при температуре 30-50°C и повторно загружают в хроматографическую колонку с обращенной фазой на стадии а), сбор двух компонентов, примерно соответствующих пикам α -пуикалагина и β -пуикалагина соответственно, где собранный компонент, примерно соответствующий α -пуикалагину, концентрируют с помощью роторного испарителя при температуре 30-50°C и лиофилизируют в виде бледно-желтого порошка пуикалагина с чистотой выше 98%, как определено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии; при этом собранный компонент, примерно соответствующий пику β -пуикалагина, концентрируют с помощью роторного испарителя при температуре 30-50°C и повторно очищают в тех же хроматографических условиях, что и на стадии а), с получением пуикалагина высокой чистоты.

Предпочтительно в способе очистки пуикалагина согласно настоящему изобретению на стадии б) 0,1-10 г экстракта кожуры граната взвешивают и растворяют в 10-50 мл воды.

Предпочтительно в способе очистки пуикалагина согласно настоящему изобретению на стадии б) раствор центрифугируют при скорости вращения 5000-10000 об/мин в течение 3-5 мин.

Способ очистки пуикалагина согласно настоящему изобретению характеризуется тем, что концентрирование осуществляют с уменьшением объема до 10-50 мл. Более предпочтительно концентрирование осуществляют с применением роторного испарителя.

Согласно любому из описанных выше способов очистки пуикалагина по настоящему изобретению в качестве предпочтительного способа, способ очистки, основанный на особенностях изомеризации пуикалагина, по настоящему изобретению осуществляют с помощью следующих стадий:

а) отбор хроматографической колонки с обращенной фазой полупромышленного масштаба, где подвижная фаза состоит из метанола и 0,1%-ного водного раствора муравьиной кислоты в объемном соотношении 12:88, скорость потока контролируют на уровне 180 мл/мин, устанавливают температуру на уровне комнатной температуры, длина волны УФ-детектирования составляет 254 и 366 нм, колонку уравнивают в течение 15 мин перед применением;

б) взвешивание 6 г экстракта кожуры граната, растворение их в 20 мл воды, отбор надосадочной жидкости после центрифугирования раствора экстракта при 10000 об/мин в течение 5 мин и загрузка его в уравнивающую хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба через шестиходовую клапан, сбор двух компонентов, примерно соответствующих двум хроматографическим пикам α -пуикалагина и β -пуикалагина, концентрирование двух компонентов до 20 мл с помощью роторного испарителя при 50°C соответственно;

в) повторная загрузка концентрированного собранного компонента, примерно соответствующего пику α -пуикалагина, полученного на стадии б), в хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба для вторичного разделения в тех же условиях, что и на стадии а), и сбор двух компонентов примерно соответствующих хроматографическим пикам α -пуикалагина и β -пуикалагина соответственно, где собранный компонент, примерно соответствующий пику β -пуикалагина, концен-

трируют с помощью роторного испарителя при температуре 39°C и лиофилизируют в виде 137 мг бледно-желтого порошка пуникалагина с чистотой выше 98% после определения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии; концентрирование собранного компонента, примерно соответствующего пику α -пуникалагина, до объема 20 мл с помощью роторного испарителя при температуре 50°C и повторная загрузка концентрированного компонента в тех же хроматографических условиях, что и на стадии а), с получением пуникалагина высокой чистоты; или

повторная загрузка концентрированного собранного компонента, примерно соответствующего пику β -пуникалагина, полученного на стадии б), в хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба в тех же условиях, что и на стадии а), и сбор двух хроматографических пиков, примерно соответствующих пикам α -пуникалагина и β -пуникалагина соответственно, где собранный компонент, примерно соответствующий пику α -пуникалагина, представляет собой необходимый продукт; концентрирование собранного компонента, примерно соответствующего пику β -пуникалагина, до объема 20 мл с помощью роторного испарителя при температуре 50°C, повторная загрузка концентрированного компонента в хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба на стадии а), сбор компонентов, примерно соответствующих двум хроматографическим пикам α -пуникалагина и β -пуникалагина соответственно, где собранный компонент, примерно соответствующий пику α -пуникалагина, представляет собой необходимый продукт; объединение двух собранных компонентов, примерно соответствующих пику α -пуникалагина, концентрирование объединенных компонентов с помощью роторного испарителя при температуре 39°C, осуществление лиофилизации концентрированных компонентов с получением 280 мг бледно-желтого порошка пуникалагина с чистотой выше 98% после определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии; концентрирование собранного компонента, примерно соответствующего пику β -пуникалагина, до объема 20 мл с помощью роторного испарителя при температуре 50°C и повторная загрузка концентрированного компонента в тех же хроматографических условиях, что и на стадии а), с получением пуникалагина высокой чистоты.

Способ очистки пуникалагина, основанный на особенностях изомеризации, по настоящему изобретению характеризуется тем, что хроматографическая колонка, применяемая в способе, представляет собой хроматографическую колонку с обращенной фазой C18, где применяемый петлевой дозатор объемом 30 мл используется для загрузки образцов, который больше, чем объем образца, т.е. 20 мл.

Способ очистки пуникалагина, основанный на особенностях изомеризации, по настоящему изобретению представляет собой способ очистки на основе изомеризации, разработанный на основе характеристик изомеризации пуникалагина, и используется для периодического получения пуникалагина высокой чистоты. Способ является простым и практичным, может быть использован для получения в большом масштабе. Чистота полученного пуникалагина составляет более 98%. Установленный способ, основанный на особенностях изомеризации, является подходящим для очистки изомеризируемых соединений, что является новаторским и показательным.

Описание графических материалов

На фиг. 1 представлена хроматограмма, полученная с помощью хроматографии с обращенной фазой в полупромышленном масштабе, экстракта кожуры граната, предусмотренного в настоящем изобретении.

На фиг. 2 представлена хроматограмма, полученная с помощью препаративной хроматографии, компонента 1 на основе α -пуникалагина, предусмотренного в настоящем изобретении, после его концентрирования и повторной загрузки в хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба.

На фиг. 3 представлена диаграмма для жидкостной хроматографии для определения компонента 3 на основе β -пуникалагина, полученного в соответствии с настоящим изобретением.

На фиг. 4 представлена хроматограмма, полученная с помощью препаративной хроматографии, компонента 4 на основе β -пуникалагина, предусмотренного в настоящем изобретении, после его концентрирования и повторной загрузки в хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба.

На фиг. 5 представлена диаграмма для жидкостной хроматографии для определения объединенного компонента 5 на основе α -пуникалагина и компонента 7 на основе α -пуникалагина, полученных в соответствии с настоящим изобретением.

Конкретные варианты осуществления изобретения

Настоящее изобретение будет более подробно описано ниже в сочетании с конкретными вариантами осуществления.

Пример 1.

а) Применяли хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба, где колонка имела размер 250 мм (длина колонки)×80 мм (внутренний диаметр); ее наполнитель характеризовался размером частиц 10 мкм; подвижная фаза состояла из метанола и 0,1%-ного водного раствора муравьиной кислоты в объемном соотношении 12:88; скорость потока поддерживалась на уровне 180 мл/мин; температуру устанавливали на уровне комнатной температуры, длина волны

УФ-детектирования составляла 254 и 366 нм, колонку уравнивали в течение 15 мин, и колонка была готова к использованию.

b) Взвешивали 6 г экстракта кожуры граната, в котором содержание пуникалагина составляло приблизительно 32%. Экстракт растворяли в 20 мл воды и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость собирали и загружали в уравниваемую хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба через шестиходовой клапан, как показано на фиг. 1. Компонент, обозначенный как компонент 1, во временном диапазоне от 10 до 15 мин, т.е. α -пуникалагин, собирали в резервуаре для компонентов и концентрировали до объема 20 мл с помощью роторного испарителя при 50°C соответственно.

с) Компонент 1 повторно загружали в уравниваемую хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба в соответствии со стадией а). Его хроматограмма показана на фиг. 2. Компоненты, обозначенные как компонент 2, пики которого находятся во временном диапазоне от 12,5 до 20 мин (примерно соответствующие α -пуникалагину), и компонент 3, пики которого находятся во временном диапазоне от 25 до 35 мин (примерно соответствующие β -пуникалагину), собирали в разные резервуары для компонентов соответственно. Компонент 3 концентрировали с помощью роторного испарителя при температуре 39°C, лиофилизировали с получением бледно-желтого порошка. Такой порошок весил в целом 137 мг и продемонстрировал чистоту более 98% после определения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, как показано на фиг. 3. Компонент 2 концентрировали до объема 20 мл с помощью роторного испарителя при температуре 50°C и повторно загружали в тех же хроматографических условиях, что и на стадии а), с получением пуникалагина высокой чистоты.

Пример 2.

а) Применяли хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба, где колонка имела размер 250 мм (длина колонки)×80 мм (внутренний диаметр); ее наполнитель характеризовался размером частиц 10 мкм; подвижная фаза состояла из метанола и 0,1%-ного водного раствора муравьиной кислоты в объемном соотношении 12:88; скорость потока поддерживалась на уровне 180 мл/мин; температуру устанавливали на уровне комнатной температуры, длина волны УФ-детектирования составляла 254 и 366 нм, колонку уравнивали в течение 15 мин, и колонка была готова к использованию.

b) Взвешивали 6 г экстракта кожуры граната, в котором содержание пуникалагина составляло приблизительно 32%. Экстракт растворяли в 20 мл воды и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость собирали и загружали в уравниваемую хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба через шестиходовой клапан, как показано на фиг. 1. Компонент, обозначенный как компонент 4, примерно соответствующий β -пуникалагину (в диапазоне от 17 до 30 мин), собирали в резервуаре для компонентов и концентрировали до объема 20 мл с помощью роторного испарителя при 50°C соответственно.

с) Компонент 4 повторно загружали в уравниваемую хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба в соответствии со стадией а). Его хроматограмма показана на фиг. 4. Компоненты, обозначенные как компонент 5, пики которого находятся во временном диапазоне от 12,5 до 20 мин (примерно соответствующие α -пуникалагину), и компонент 6, пики которого находятся во временном диапазоне от 25 до 35 мин (примерно соответствующие β -пуникалагину), собирали в разные резервуары для компонентов соответственно. Компонент 5 представлял собой необходимый продукт.

Компонент 6 концентрировали до объема 20 мл с помощью роторного испарителя при температуре 50°C и повторно загружали в уравниваемую хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба в соответствии со стадией а). Его хроматограмма также представлена на фиг. 4. Компоненты, обозначенные как компонент 7, пики которого находятся во временном диапазоне от 12,5 до 20 мин (примерно соответствующие α -пуникалагину), и компонент 8, пики которого находятся во временном диапазоне от 25 до 35 мин (примерно соответствующие β -пуникалагину), собирали в разные резервуары для компонентов соответственно. Компонент 7 на основе α -пуникалагина представлял собой необходимый продукт. Его объединяли с компонентом 5 и концентрировали с помощью роторного испарителя при температуре 39°C, затем лиофилизировали с получением бледно-желтого порошка. Такой порошок весил в целом 280 мг и продемонстрировал чистоту более 98% после определения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, как показано на фиг. 5. Компонент 8 концентрировали до объема 20 мл с помощью роторного испарителя при температуре 50°C и повторно загружали в тех же хроматографических условиях, что и на стадии а), с получением пуникалагина высокой чистоты.

Помимо смеси метанола и 0,1%-ного водного раствора муравьиной кислоты, подвижная фаза хроматографической колонки с обращенной фазой, применяемой в примерах, также может представлять собой смесь ацетонитрила и 0,1%-ного водного раствора муравьиной кислоты, смесь тетрагидрофурана и 0,1%-ного водного раствора муравьиной кислоты, смесь метанола, ацетонитрила и 0,1%-ного водного раствора муравьиной кислоты, смесь метанола, тетрагидрофурана и 0,1%-ного водного раствора муравьиной кислоты.

иной кислоты, смесь ацетонитрила, тетрагидрофурана и 0,1%-ного водного раствора муравьиной кислоты, смесь метанола, ацетонитрила, тетрагидрофурана и 0,1%-ного водного раствора муравьиной кислоты. Содержание 0,1%-ного водного раствора муравьиной кислоты должно находиться в диапазоне от 50 до 95% в подвижной фазе.

В дополнение к хроматографической колонке с обращенной фазой C18 также можно применять другие хроматографические колонки с обращенной фазой в качестве хроматографических колонок с обращенной фазой в примерах, включая колонку с обращенной фазой C8, колонку с обращенной фазой C4, колонку с обращенной фазой C30, колонку с обращенной фазой C2, колонку с обращенной фазой с цианогруппами, полистирольную колонку с обращенной фазой.

Помимо длины колонки 250 мм, внутреннего диаметра 80 мм и размера частиц наполнителя 10 мкм, хроматографическая колонка с обращенной фазой, применяемая в примерах, также может характеризоваться длиной колонки 50-1000 мм, внутренним диаметром 2,1-2000 мм и размером частиц наполнителя 1,2-500 мкм.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки пуникалагина, основанный на особенностях изомеризации, включающий следующие стадии:

а) отбор хроматографической колонки с обращенной фазой, где подвижная фаза состоит из метанола и 0,01-5% водного раствора муравьиной кислоты в объемном соотношении 1-5:9-5, скорость потока контролируют на уровне 50-300 мл/мин, длина волны УФ-детектирования составляет 220-280 и 350-380 нм и колонку уравнивают в течение 3-30 мин;

б) взвешивание экстракта кожуры граната, растворение указанного экстракта в воде, отбор надосадочной жидкости после центрифугирования раствора экстракта и загрузка его в уравновешенную хроматографическую колонку с обращенной фазой, сбор двух компонентов, примерно соответствующих хроматографическим пикам α -пуникалагина и β -пуникалагина соответственно, затем концентрирование двух компонентов при 30-50°C соответственно;

с) повторная загрузка концентрированного компонента, соответствующего пику α -пуникалагина, полученного на стадии б), в хроматографическую колонку с обращенной фазой при тех же условиях, что и на стадии а), и сбор компонентов, примерно соответствующих двум хроматографическим пикам α -пуникалагина и β -пуникалагина соответственно, где собранный компонент, примерно соответствующий хроматографическому пику β -пуникалагина, концентрируют с помощью роторного испарителя при температуре 30-50°C и лиофилизируют с получением порошка пуникалагина с чистотой выше 98% после определения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии; концентрирование собранного компонента, соответствующего хроматографическому пику α -пуникалагина, с помощью роторного испарителя при температуре 30-50°C и повторная загрузка концентрированного компонента в тех же хроматографических условиях, что и на стадии а), с получением пуникалагина высокой чистоты; и/или

повторная загрузка концентрированного собранного компонента, соответствующего хроматографическому пику β -пуникалагина, полученного на стадии б), в хроматографическую колонку с обращенной фазой в тех же условиях, что и на стадии а), и сбор компонентов, примерно соответствующих двум хроматографическим пикам α -пуникалагина и β -пуникалагина соответственно, где собранный компонент, соответствующий хроматографическому пику α -пуникалагина, представляет собой необходимый продукт; концентрирование собранного компонента, соответствующего хроматографическому пику β -пуникалагина, с помощью роторного испарителя при температуре 30-50°C, повторная загрузка концентрированного компонента в хроматографическую колонку с обращенной фазой со стадии а), сбор компонентов, соответствующих двум хроматографическим пикам α -пуникалагина и β -пуникалагина соответственно, где собранный компонент, соответствующий хроматографическому пику α -пуникалагина, представляет собой необходимый продукт; объединение двух собранных компонентов, соответствующих хроматографическому пику α -пуникалагина, и собранного компонента, соответствующего хроматографическому пику β -пуникалагина, на стадии с), концентрирование объединенных компонентов с помощью роторного испарителя при температуре 30-50°C, осуществление лиофилизации концентрированных компонентов с получением бледно-желтого порошка пуникалагина с чистотой выше 98% после определения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии; концентрирование собранного компонента, соответствующего хроматографическому пику β -пуникалагина, при температуре 30-50°C и повторная загрузка концентрированного компонента в тех же хроматографических условиях, что и на стадии а), с получением пуникалагина высокой чистоты.

2. Способ очистки пуникалагина по п.1, отличающийся тем, что на стадии б) 0,1-10 г экстракта кожуры граната взвешивают и растворяют в 10-50 мл воды.

3. Способ очистки пуникалагина по п.1, отличающийся тем, что на стадии б) раствор экстракта центрифугируют при скорости вращения 5000-10000 об/мин в течение 3-10 мин.

4. Способ очистки пуникалагина по п.1, отличающийся тем, что концентрирование осуществляют с

уменьшением объема до 10-50 мл.

5. Способ очистки пуникалагина по п.1 или 4, отличающийся тем, что концентрирование осуществляют с помощью роторного испарителя.

6. Способ очистки пуникалагина по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что его осуществляют с помощью следующих стадий:

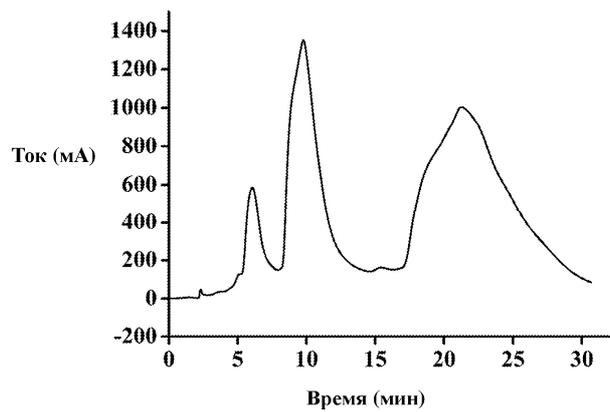
а) отбор хроматографической колонки с обращенной фазой полупромышленного масштаба, где подвижная фаза состоит из метанола и 0,1%-ного водного раствора муравьиной кислоты в объемном соотношении 12:88, скорость потока контролируют на уровне 180 мл/мин, устанавливают температуру на уровне комнатной температуры, длина волны УФ-детектирования составляет 254 и 366 нм, колонку уравнивают в течение 15 мин и колонка готова к использованию;

б) взвешивание 6 г экстракта кожуры граната, растворение их в 20 мл воды, отбор надосадочной жидкости после центрифугирования раствора экстракта при 10000 об/мин в течение 5 мин и загрузка его в уравновешенную хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба через шестиходовой клапан, сбор компонентов, соответствующих двум хроматографическим пикам α -пуникалагина и β -пуникалагина, концентрирование двух компонентов до объема 20 мл с помощью роторного испарителя при 50°C соответственно;

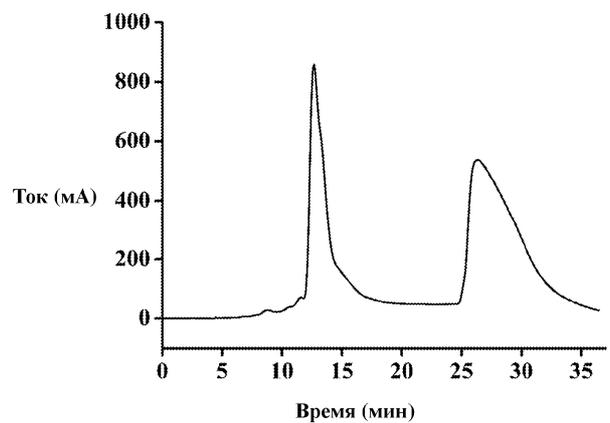
с) повторная загрузка концентрированного собранного компонента, соответствующего хроматографическому пику α -пуникалагина, полученного на стадии б), в хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба в тех же условиях, что и на стадии а), и сбор компонентов, примерно соответствующих двум хроматографическим пикам α -пуникалагина и β -пуникалагина соответственно, где собранный компонент, соответствующий хроматографическому пику β -пуникалагина, представляет собой необходимый продукт; концентрирование необходимого продукта с помощью роторного испарителя при температуре 39°C и осуществление лиофилизации необходимого продукта с получением 137 мг бледно-желтого порошка пуникалагина с чистотой выше 98% после определения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии; концентрирование собранного компонента, соответствующего хроматографическому пику α -пуникалагина, до объема 20 мл с помощью роторного испарителя при температуре 50°C и повторная загрузка концентрированного компонента в тех же хроматографических условиях, что и на стадии а), с получением пуникалагина высокой чистоты; или

повторная загрузка концентрированного собранного компонента, соответствующего хроматографическому пику β -пуникалагина, полученного на стадии б), в хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба в тех же условиях, что и на стадии а), и сбор двух компонентов, соответствующих двум хроматографическим пикам α -пуникалагина и β -пуникалагина соответственно, где собранный компонент, соответствующий хроматографическому пику α -пуникалагина, представляет собой необходимый продукт; концентрирование собранного компонента, соответствующего пику β -пуникалагина, до объема 20 мл с помощью роторного испарителя при температуре 50°C, повторная загрузка концентрированного компонента в хроматографическую колонку с обращенной фазой полупромышленного масштаба со стадии а), сбор двух компонентов, соответствующих двум хроматографическим пикам α -пуникалагина и β -пуникалагина соответственно, где собранный компонент, соответствующий хроматографическому пику α -пуникалагина, представляет собой необходимый продукт; объединение двух собранных компонентов, соответствующих хроматографическому пику α -пуникалагина, и компонента, соответствующего хроматографическому пику β -пуникалагина, на стадии с), концентрирование объединенных компонентов при температуре 39°C, осуществление лиофилизации концентрированных компонентов с получением 280 мг бледно-желтого порошка пуникалагина с чистотой выше 98% после определения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии; концентрирование собранного компонента, соответствующего хроматографическому пику β -пуникалагина, с помощью роторного испарителя до объема 20 мл при температуре 50°C и повторная загрузка концентрированного компонента в тех же хроматографических условиях, что и на стадии а), с получением пуникалагина высокой чистоты.

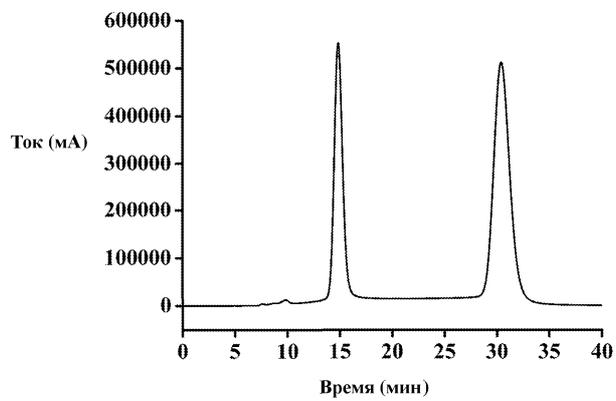
042579



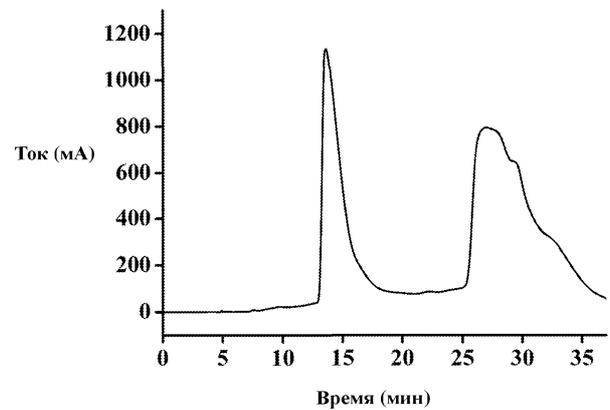
Фиг. 1



Фиг. 2

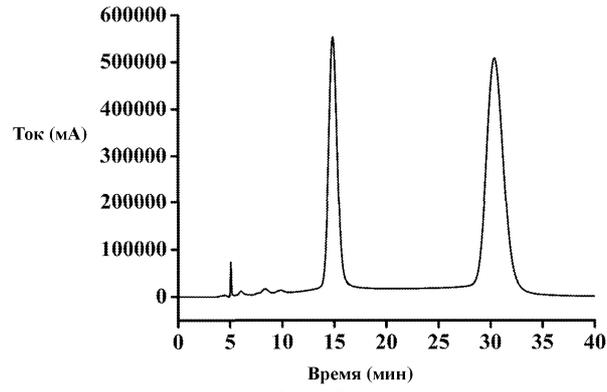


Фиг. 3



Фиг. 4

042579



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
