

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043560**

(13) **B1**

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

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.31
- (21) Номер заявки
202100294
- (22) Дата подачи заявки
2021.08.31
- (51) Int. Cl. **C07D 311/30** (2006.01)
C07D 311/40 (2006.01)
B01D 11/04 (2006.01)
C07C 9/15 (2006.01)
C07C 69/14 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДНЫХ АГЛИКОНОВ ИЗ ВОДНОЙ СРЕДЫ**

- (43) **2022.02.28**
- (96) **2021/022 (AZ) 2021.08.31**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГАРАЕВ ЭЛЬДАР АБДУЛЛА ОГЛЫ;
НАСИРЛИ ИЛЬКИН УЗЕИР ОГЛЫ
(AZ)**
- (72) Изобретатель:
**Гараев Эльдар Абдулла оглы,
Мовсумов Исафили Солтан оглы,
Насирли Илькин Узеир оглы (AZ)**
- (74) Представитель:
Насирли И.У. (AZ)
- (56) CN-C-100355744
CN-A-104557833
US-A1-20080254149

-
- (57) Изобретение относится к технологическому процессу выделения флавоноидных агликонов (флавоноловых и флавононов) из водного остатка экстрагентом, состоящим из этилацетат-гексана, и может быть использовано в фармацевтической промышленности для получения лекарственных препаратов. Сущность изобретения состоит в том, что для экстракции флавоноидных агликонов (флавоноловых и флавононов) из водного остатка, полученного после экстракции водно-этанольной смесью надземных частей сухого растительного сырья, представляющего собой *Lepidium campestre* L., *Scabiosa georgica* Sulak и *Dorycnium graecum* L., в качестве экстрагента используют смесь этилацетат-гексан в соотношении 1:1,4, которая не уступает по экстрагируемой способности диэтиловому эфиру. При этом выход кемпферола составляет 0,321±0,002 мг на 1 кг сухого сырья *Lepidium campestre* L., выход лютеолина составляет 0,214±0,002 мг на 1 кг сухого сырья *Scabiosa georgica* Sulak и выход мирицетина составляет 0,291±0,002 мг на 1 кг сухого сырья *Dorycnium graecum* L.

B1

043560

043560

B1

Изобретение относится к технологическому процессу, в частности способу разработки состава экстрагента, состоящего из этилацетат-гексана, для выделения флавоноидных агликонов и может быть использовано в фармацевтической промышленности для получения лекарственных препаратов, предназначенных для этой цели.

Флавоноиды занимают особое место среди биологически активных веществ растительного происхождения. Эти вещества наиболее многочисленная (более 8000 веществ) группа растительных полифенолов. Флавоноиды являются природными вторичными метаболитами растений. Они обладают антиоксидантной активностью, антиаллергическими, противовирусными, противовоспалительными, нейропротекторными и антиканцерогенными свойствами. Способность флавоноидов снижать риск развития некоторых хронических заболеваний (сердечно-сосудистых, сахарного диабета типа 2, некоторых видов рака и др.) вызвали огромный интерес специалистов, работающих в фармацевтической промышленности. Флавоноиды присутствуют в растениях в виде агликонов и гликозидов. Агликоны иногда называются генинами, они определяют характер биологической активности флавоноидов. Гликозиды - это гликозилированные формы агликонов. Флавоноидные агликоны представляют собой полифенольные соединения, по степени окисленности гетероцикла различают флавонолы и флавононы. По химической структуре флавонолы отличаются от флавононов наличием двойной связи между атомами C2 и C3, а также гидроксильной группы в положении C3. Выделено и идентифицировано более 200 флавоноловых агликонов. Наиболее распространенными в природе и изученными флавоноловыми агликонами являются кверцетин, кемпферол, мирицетин, изорамнетин, физетин, рамнетин, гербацетин, госсипетин, морин и др. Относительно флавонолов флавононы менее распространенная группа флавоноидов. Хорошо известными представителями флавононов являются лютеолин, апигенин, акацетин, байкалеин, вогонин, диосметин, скутулареин, трицин, хризин и др. Многие флавоноидные агликоны обладают высокой биологической активностью и широко применяются в медицине. Например, кверцетин проявляет антимикробную активность, является ингибитором протеинкиназы C, митоген-активируемой протеинкиназы (MAP-киназы), фосфолипазы A2, Mg²⁺ - АТФ-азы, Ca²⁺ - АТФ-азы, обратной транскриптазы, HIV-1-протеиназы, HIV-1-интегразы, влияет на процессы селекции Т-лимфоцитов, ингибирует образование цитотоксичных лимфоцитов и агрегацию тромбоцитов. Апигенин ингибирует рост клеток рака щитовидной железы путем подавления фосфорилирования рецептора фактора роста эпидермиса (EGF-R) и митоген-активируемой протеинкиназы (MAP), усиливает экспрессию супрессора опухолей, белка p53 и белка супрессии ретинобластомы Rb [1].

Флавоноидные агликоны (кверцетин, кемпферол, мирицетин, изорамнетин, лютеолин и др.) растворяются в диэтиловом эфире, ацетоне, спиртах и почти не растворяются в бензоле и хлороформе. Очень незначительная часть агликонов растворяется в хлороформе [1].

Диэтиловый эфир (Diethyl ether) или же этиловый эфир (CAS 60-29-7) является высокотоксичным, взрывоопасным, чрезвычайно огнеопасным и не удовлетворяет критериям в соответствии с Регламентом (ЕС) № 1272/2008 (CLP - Classification, Labelling, Packaging) по классификации, маркировке и упаковке химических веществ и смесей. Регламент CLP характеризует опасность химических веществ и смесей.

Известен способ выделения агликонов из водной фазы с помощью диэтилового эфира [1]. Получение флавоноидов из растительного сырья состоит из следующих этапов: 1) получают спиртовое или водно-спиртовое извлечение; 2) полученное извлечение упаривают до водного остатка (при необходимости разбавляют водой); 3) из водной фазы удаляют неполярные соединения с помощью хлороформа или четыреххлористого углерода; 4) из очищенной водной фазы извлекают агликоны диэтиловым эфиром, затем последовательно монозиды этилацетатом, биозиды и дигликозиды n-бутанолом [1].

Применение этилового эфира в качестве экстрагента имеет ряд недостатков: пар тяжелее воздуха и может стелиться по земле; возможно возгорание на расстоянии. В результате вытекания, перемешивания и др. могут образоваться электростатические заряды. Может образовывать взрывоопасные перекиси под воздействием света и воздуха. Могут быть причиной самовоспламенения при хранении и взрыва при его перегонке "досуха". Реагирует бурно с галогенами, соединениями серы и окислителями с опасностью пожара и взрыва. Агрессивен в отношении пластиков и резины [2].

Для применения этилового эфира требуется соблюдение строгих условий: закрытая система, вентиляция, взрывобезопасное электрооборудование и освещение. Нельзя допускать накопление электростатического заряда (напр., заземлением). Нельзя использовать сжатый воздух для заполнения, выпуска или при обращении. Необходимо использовать инструменты, не дающие искр. Не допускать контакта с горячими поверхностями. Следует избегать попадания на кожу и в глаза при открытом способе применения [3, 4].

Цель изобретения состоит в замене высокотоксичного, взрывоопасного и чрезвычайно огнеопасного этилового эфира на безопасный и малотоксичный состав экстрагента, но при этом обеспечивающий максимальное извлечение флавоноидных агликонов из водной среды на одном из этапов получения флавоноидов.

Из нескольких одинаково пригодных растворителей предпочтение отдают менее взрывобезопасному, огнеопасному и менее токсичному.

Задача решена тем, что в качестве экстрагента флавоноидных агликонов используют смесь раство-

рители этилацетата с гексаном в соотношении 1:1,4.

Сущность изобретения состоит в использовании неядовитого, не взрывоопасного и более доступного экстрагента с составом растворителей этилацетат-гексан в соотношении 1:1,4, позволяющего получить максимальное количество флавоноидных агликонов из водной среды.

Способ разработки оптимального состава экстрагента выполняется следующим образом.

Объектами для исследования выбрали растения, содержащие представители флавоноловых агликонов (кемпферол, мирицетин) и представители флавононов (лютеолин). Для экстрагирования использовали разные соотношения растворителей этилацетат-гексан (измерения проводили по 5 раз), в качестве контрольного экстрагента применили диэтиловый эфир (см. примеры 1-3).

Пример 1. 1,0 кг воздушно-сухих, измельченных надземных органов *Lepidium campestre* L. экстрагировали 95%-ным C_2H_5OH в соотношении 1:8, дважды. Через каждые 24 ч экстракты декантировали, объединяли, упаривали в вакууме до 150-200 мл, добавили 150-200 мл воды, продолжали упаривание до водного остатка. Водный раствор последовательно обрабатывали хлороформом, смесью этилацетат-гексан в соотношениях, указанных в таблице. Из этилацетат-гексанового извлечения после упаривания и перекристаллизации из водного этанола получили вещество кемпферол.

Пример 2. 1,0 кг высушенных и измельченных цветочных корзинок *Scabiosa georgica* Sulak., экстрагировали 80%-ным этанолом дважды. Экстракты объединяли, упаривали до водного остатка и последовательно обрабатывали гексаном, хлороформом, смесью этилацетат-гексан в соотношениях, указанных в таблице. Из извлечения смесью этилацетат-гексан получили лютеолин.

Пример 3. 1,0 кг высушенных и измельченных надземных частей *Dorycnium graecum* (L.) S e r i n D.C. экстрагировали 80%-ым этанолом при комнатной температуре в течение 24 ч, трижды. Экстракты объединяли, упаривали до водного остатка и последовательно обрабатывали гексаном, хлороформом, смесью этилацетат-гексан в соотношениях, указанных в таблице. Из смеси этилацетат-гексан получили мирицетин.

Полученные результаты по выходу флавоноидных агликонов при различных соотношениях растворителей этилацетат-гексан изображены в таблице.

Выход флавоноидных агликонов при различных соотношениях растворителей этилацетат-гексан

Этилацетат-гексан	Флавоноидные агликоны, мг ($\pm 0,002$)		
	кемпферол	лютеолин	мирицетин
1:1,0	0,232	0,174	0,217
1:1,2	0,283	0,192	0,264
1:1,4	0,321	0,214	0,291
1:1,7	0,314	0,205	0,282
1:2,0	0,241	0,165	0,241
Этиловый эфир	0,322	0,218	0,287

Прим.: выход флавоноидных агликонов на 1 кг сухого растительного сырья.

Как видно из таблицы, по сравнению с этиловым эфиром лучшие результаты выхода веществ показывает экстрагент этилацетат-гексан в соотношении 1:1,4 (для кемпферола - 0,321 мг (99,98%), для лютеолина - 0,214 мг (99,9%), для мирицетина - 0,291 мг (99,99%) на 1 кг сухого сырья), немного худшие - в соотношении 1:1,7 (0,241 мг, 0,165 мг и 0,241 мг соответственно). Выход для кемпферола в соотношении этилацетат-гексан 1:1,2 - 88%, при 1:1,7 - 97,8%, для лютеолина в соотношении этилацетат-гексан 1:1,2 - 89,7%, при 1:1,7 - 95,7%, для мирицетина в соотношении этилацетат-гексан 1:1,2 - 90,7%, при 1:1,7 - 96,9%.

Таким образом, для выделения флавоноидных агликонов из растительного сырья разработан оптимальный состав экстрагента. Для этой цели может быть использован экстрагент, состоящий из этилацетат-гексана в соотношении 1:1,4.

Литература.

1. Макарова М.Н., Макаров В.Г. Молекулярная биология флавоноидов (химия, биохимия, фармакология): Руководство для врачей. СПб., 2010. 428 с.

2. Писарев Д.И., Новиков О.О., Селютин О.А., Писарева Н.Л. Биологическая активность полифенолов растительного происхождения. Перспектива использования антоцианов в медицинской практике // Серия Медицина. Фармация. 2012. № 10 (129). Выпуск 18/2. с. 17-24.

3. <https://www.safework.ru/content/cards/RUS0355.HTM>. Диэтиловый эфир.

4. Паспорт безопасности в соответствии с Регламентом (ЕС) № 1907/2006 (REACH), с поправками, внесенными 453/2010/ЕС Диэтиловый эфир.

Используемые вещества и аппаратура.

1. Растворители диэтиловый эфир (Diethyl ether), Uvasol®, этилацетат (Sigma-Aldrich, 99,7%), н-гексан ((n-Hexane), Prepsolv®).

2. Делительная воронка.
3. Весы Wincom Электрический Аналитический JA303P (макс вес 600 г).
4. Весы Aoste электрический HS-1002R (макс вес 1002 г).
5. Спирт этиловый (этанол) C₂H₆O, Sigma-Aldrich 459836, квалификация 99,5%.
6. Колба 5000 мл GG-17, 29/32.
7. Хлороформ EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur 2,5 1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ экстракции флавоноидных агликонов из водного остатка, полученного после экстракции водно-этанольной смесью надземных частей сухого растительного сырья, представляющего собой *Lepidium campestre* L., *Scabiosa georgica* Sulak и *Dogonidium graecum* L., отличающийся тем, что в качестве экстрагента используют смесь этилацетат-гексан в соотношении 1:1,4, которая не уступает по экстрагируемой способности диэтиловому эфиру, и при этом выход кемпферола составляет $0,321 \pm 0,002$ мг на 1 кг сухого сырья *Lepidium campestre* L., выход лютеолипа составляет $0,214 \pm 0,002$ мг на 1 кг сухого сырья *Scabiosa georgica* Sulak, и выход мирицетина составляет $0,291 \pm 0,002$ мг на 1 кг сухого сырья *Dogonidium graecum* L.

