



(51) МПК
A61K 36/06 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)
B01D 11/02 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013116569/15, 11.04.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 11.04.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.04.2013

(45) Опубликовано: 20.07.2014 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: (см. прод.)

Адрес для переписки:

420015, Татарстан, г.Казань, ул. К. Маркса, 68,
 ФГБОУ ВПО "КНИТУ", отдел патентно-
 изобретательской деятельности

(72) Автор(ы):

Сысоева Мария Александровна (RU),
 Хабибрахманова Венера Равиловна (RU),
 Никитина Светлана Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 профессионального образования "Казанский
 национальный исследовательский
 технологический университет" (ФГБОУ
 ВПО "КНИТУ") (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФРАКЦИИ ЛИПОФИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ЧАГИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к способу получения биологически активных липофильных соединений на основе лекарственного сырья - гриба чаги. Способ заключается в том, что из водного экстракта чаги осаждают меланин путем добавления водного раствора хлористоводородной кислоты, затем меланин экстрагируют петролейным эфиром при перемешивании до получения смеси однородной

консистенции, полученную смесь замораживают, а после размораживания отделяют слой органического экстракта, удаляют растворитель с получением сухого остатка фракции липофильных веществ. Способ позволяет извлечь из чаги фракцию липофильных веществ, включающих стероидные соединения, которые обладают выраженной биологической активностью. 2 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

W. MAZURKIEWICZ et all. Separation of an aqueous extract Inonotus Obliquus (Chaga), a novel look at the efficiency of its influence on proliferation of A549 human lung carcinoma cells.// Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research., Vol.67, No4, 2010, pp.397-406 СЫСОЕВА М.А. Высокоактивные антиоксиданты на основе гриба (Inonotus obliquus) //Автореферат дисс. На соиск. Ученой степени доктора хим. Наук, Казань 2009, стр.16,25-27 ZHANG M et ll. Analysis of antioxidant metabolites by solvent extraction from sclerotia of Inonotus obliquus (Chaga) //Phytochem Anal., 2011, 22(2): 95-102 KR20070064225 A, 20.06.2007



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 36/06 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)
B01D 11/02 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013116569/15, 11.04.2013

(24) Effective date for property rights:
11.04.2013

Priority:

(22) Date of filing: 11.04.2013

(45) Date of publication: 20.07.2014 Bull. № 20

Mail address:

420015, Tatarstan, g.Kazan', ul. K. Marksa, 68,
FGBOU VPO "KNITU", otdel patentno-
izobretatel'skoj dejatel'nosti

(72) Inventor(s):

Sysoeva Marija Aleksandrovna (RU),
Khabibrakhmanova Venera Ravilevna (RU),
Nikitina Svetlana Aleksandrovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego
professional'nogo obrazovanija "Kazanskij
natsional'nyj issledovatel'skij tekhnologicheskij
universitet" (FGBOU VPO "KNITU") (RU)

(54) **METHOD OF OBTAINING LIPOPHILIC SUBSTANCES FROM CHAGA**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: melanin is precipitated from a water extract of chaga by addition of a water solution of hydrochloric acid, then melanin is extracted by petroleum-ether with mixing until a mixture with a homogenous consistence is obtained, the obtained mixture is frozen, and after defrosting an organic extract layer is separated,

a solvent is removed with obtaining a dry residue of a fraction of lipophilic substances.

EFFECT: method makes it possible to extract the fraction of lipophilic substances, which include sterol compounds, possessing an expressed biological activity, from chaga.

2 tbl, 4 ex

R U 2 5 2 2 9 5 2 C 1

R U 2 5 2 2 9 5 2 C 1

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, а именно к получению фракции биологически активных липофильных соединений на основе лекарственного сырья - гриба чаги.

Природные липофильные вещества, в частности стериновые соединения, обладают высоким фармакологическим потенциалом. Для ряда этих соединений, выделенных из чаги, показаны высокие противоопухолевые, иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства (Kahlos K. [and others] // *Planta Medica*. - 1986. - №52. - P. 554, Nakata T. [and others] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. - 2007.- V.15, I. 1. - P.257-264; M.J. Chung [and others] // *Nutrition research and practice*. - 2010. - V.4, №3. - P.177-182).

В настоящее время для получения биологически активных стериновых соединений и их производных в фармацевтической промышленности используется направленный химический синтез (Lednicer D. *Steroid chemistry at a glance* / D. Lednicer. - 2011. - 144 p.).

Недостатками химической технологии получения целевых соединений являются сложность и трудоемкость процесса, сопряженные с высокими экономическими затратами.

Известен способ выделения биологически активных соединений из сухого экстракта чаги (Г.Л. Рыжова [и др.] // *Химико-фармацевтический журнал*. - 1997. - №10. - С.44-47). Способ включает осаждение меланина путем подкисления хлористоводородной кислотой экстракта чаги, проведение гидролиза меланина в автоклаве при давлении 1,5 атм и температуре 126°C, дальнейшее экстрагирование гидролизата хлороформом и обработку бикарбонатом натрия.

Недостатком данного способа является проведение гидролиза меланина в жестких условиях (повышенное давление и высокая температура), что не позволяет выделить биологически активные соединения в нативном состоянии. Способ позволяет извлечь в основном вещества фенольной природы, из липофильных соединений удастся извлечь только высшие жирные кислоты.

Наиболее близким к заявляемому способу является способ выделения липофильных соединений из водного экстракта чаги (W. Mazurkiewicz [and others] // *Acta Poloniae Pharmaceutica*. - 2010. - V.67, I. 4. - P.397-406). Сконцентрированный и высушенный водный экстракт чаги перерастворяют в горячей воде, проводят гидролиз хлористоводородной кислотой, отделяют осадок 1, оставшийся фильтрат упаривают досуха и получают осадок 2. Осадки 1 и 2 обрабатывают этилацетатом и метанолом, полученные экстракты объединяют и удаляют растворители под вакуумом с получением сухого остатка черного цвета. Разделение веществ сухого остатка проводят с помощью колоночной хроматографии. Был идентифицирован ряд биологически активных соединений, в том числе липофильные, представленные насыщенными и ненасыщенными углеводородами, высшими алифатическими спиртами и альдегидами, высшими жирными кислотами и их эфирами.

Данный способ не позволяет извлечь из сырья стериновые соединения, а использование кислотного гидролиза, как и в вышеописанном способе, приводит к изменению химической структуры биологически активных веществ.

Технической задачей настоящего изобретения является разработка способа получения фракции биологически активных липофильных веществ, включающих стериновые соединения, из чаги.

Поставленная задача достигается способом, в котором сначала из водного экстракта чаги осаждают меланин путем добавления водного раствора хлористоводородной кислоты до pH 1,5-2,0, удаляют фильтрат, меланин экстрагируют петролейным эфиром при перемешивании до получения смеси однородной консистенции, причем массовое

соотношение меланин:петролейный эфир составляет 1:5, затем смесь замораживают, а после размораживания отделяют слой органического экстракта, удаляют растворитель с получением сухого остатка фракции липофильных веществ.

5 Технический результат заключается в получении фракции биологически активных липофильных веществ, включающих стероидные соединения.

Сущность способа заключается в следующем.

Для осаждения меланина используют водный экстракт чаги, так как экстракция чаги водой позволяет извлечь из нее максимальное количество меланина по сравнению с другими растворителями. При этом водный экстракт чаги может быть получен любым известным способом (например, способом, описанным в патенте RU №2343930). После добавления к экстракту чаги водного раствора хлористоводородной кислоты происходит осаждение меланина. После удаления фильтрата меланин с влажностью 10 $90\pm 2\%$ экстрагируют петролейным эфиром, выбор которого в качестве растворителя обоснован селективностью по отношению к липофильным веществам чаги, в том числе и к стероидным соединениям, при этом в петролейном эфире не растворяются вещества фенольной природы, содержащиеся в чаге в значительном количестве. Экстрагирование проводят при перемешивании до получения смеси однородной консистенции. Массовое соотношение меланин:эфир 1:5 является оптимальным для получения однородной стабильной при нормальных условиях смеси, разрушение которой возможно лишь при 15 замораживании. После размораживания происходит разделение смеси на два слоя: 20 верхний слой органического экстракта и нижний водный слой.

Верхний слой органического экстракта, содержащий липофильные вещества, отделяют, после удаления растворителя под вакуумом получают сухой остаток фракции липофильных веществ.

25 Изобретение иллюстрируется следующими примерами конкретного выполнения.

Получение фракции липофильных соединений проводили при использовании различных партий сырья чаги, поскольку сырье может существенно отличаться по количественному и качественному составу липофильных веществ в зависимости от места и времени сбора или от возраста гриба.

30 Пример 1.

Использовали сырье ООО «КФХ «Кентавр», партия 011209.

Водный экстракт чаги получали по фармакопейной статье (Государственная Фармакопея СССР: Вып.2. - М.: Медицина, 1990. - 400 с.).

50 г чаги заливали 1200 мл воды, настаивали 1 ч при комнатной температуре, далее 35 кипятили 2 ч, отделяли экстракт и доводили объем экстракта до 2500 мл. Из водного экстракта добавлением 25% раствора хлористоводородной кислоты до pH 1,5-2,0 осаждали 50 ± 2 г меланина, фильтрат удаляли. К меланину приливали 250 мл петролейного эфира и проводили экстрагирование при перемешивании до получения смеси однородной консистенции, затем смесь замораживали, после размораживания 40 отделяли верхний слой органического экстракта, удаляли петролейный эфир на вакуумном испарителе при 25-30°C и получали $0,033\pm 0,001$ г фракции липофильных веществ. В полученной фракции липофильных веществ показано наличие стероидных соединений, количественное содержание которых составило $2,83\pm 0,20$ мас.% от экстрактивных веществ.

45 Пример 2.

Использовали сырье ОАО «Красногорсклексредства», партия 61208.

Водный экстракт чаги получали методом ремацерации (патент RU №2343930, А61К 36/06, В01D 11/02, 2007).

50 г чаги заливали 300 мл воды, настаивали 5 ч при температуре 70°C, отделяли экстракт с первой стадии, к оставшемуся шроту чаги добавляли 200 мл воды, настаивали еще 5 ч при температуре 70°C, отделяли экстракт со второй стадии и объединяли с экстрактом с первой стадии. Из объединенного водного экстракта (390±10 мл) добавлением 25% раствора хлористоводородной кислоты до pH 1,5-2,0 осаждали 50±3 г меланина, фильтрат удаляли. К меланину приливали 250 мл петролейного эфира и проводили экстрагирование при перемешивании до получения смеси однородной консистенции, затем смесь замораживали, после размораживания отделяли верхний слой органического экстракта, удаляли петролейный эфир на вакуумном испарителе и получали 0,0387±0,0165 г фракции липофильных веществ. В полученной фракции липофильных веществ показано наличие стеринных соединений, количественное содержание которых составило 3,53±0,83 мас.% от экстрактивных веществ.

Пример 3.

Аналогичен примеру 2, но использовано сырье ОАО «Красногорсклексредства», партия 10210.

Получили 0,0097±0,0046 г фракции липофильных веществ. В полученной фракции липофильных веществ показано наличие стеринных соединений, количественное содержание которых составляет 7,98±1,46 мас.% от экстрактивных веществ.

Пример 4.

Аналогичен примеру 2, но использовано сырье ООО «КФХ «Кентавр», партия 011209.

Получили 0,0113±0,002 г фракции липофильных веществ. В полученной фракции липофильных веществ показано наличие стеринных соединений, количественное содержание которых составляет 9,9±0,3 мас.% от экстрактивных веществ.

Качественный состав полученных фракций липофильных веществ определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинах «Sorbfil» с использованием двух систем растворителей: для разделения нейтральных липофильных соединений - №1 (петролейный эфир - диэтиловый эфир - уксусная кислота в соотношении 90:10:1, Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. - М., 1975. - 324 с.) и для разделения стеринных соединений - №2 (толуол - муравьиная кислота - этилацетат в соотношении 5:1:4, Y. Shin [and others] // Journal of Wood Science. - 2001. - V.47, I. 4. - P.313-316).

Хроматограммы обрабатывали специфичным реагентом на стеринные соединения - раствором хлорного железа (Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. - М., 1975. - 324 с.). Идентификацию веществ проводили по значениям коэффициента распределения (Rf). Присутствие в экстрактах сквалена и ланостерола подтверждено использованием стандартов-метчиков: Lanosterol (№8446793-1EA Sigma-Aldrich) и Squalene (№83626-10ML Sigma-Aldrich).

Результаты хроматографии представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Качественный состав фракций липофильных веществ, выделенных из чаги	
Коэффициент распределения (R _f)	Отнесение*
0,81-0,90	углеводороды, эфиры стеринных, воски, сквален
0,54	высшие алифатические альдегиды, витамин К**
0,27-0,36	триацилглицериды
0,15-0,17	высшие жирные кислоты
0,13-0,15	высшие алифатические спирты
0,07-0,12	стерины
0,05-0,09	О-диалкиловые эфиры глицерина
0,02-0,04	1,3- и 1,2-диацилглицериды

0,00	моноацилглицериды, 1-О-моноалкиловые эфиры глицерина
* - Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс.- М., 1975. - 324 с; ** - для сырья ОАО «Красногорсклескредства», партия 10210.	

Данные, приведенные в таблице 1, показывают, что независимо от исходного сырья и способа получения водного экстракта чаги все полученные фракции липофильных соединений, содержат ряд биологически активных веществ, в том числе и стериновые соединения. Из обнаруженных веществ при хроматографировании в системе №2 были идентифицированы 5 стериновых соединений (табл.2), обладающих выраженной биологической активностью (Y. Shin [and others] // Journal of Wood Science. - 2001. - V.47, I. 4. - P.313-316.). Неидентифицированные соединения с $R_f=0,89-0,90$, $0,61-0,63$ и $0,37-0,38$ также можно отнести к стериновым веществам по специфической окраске пятен на хроматограмме.

Коэффициент распределения (R_f)	Отнесение*
0,89-0,90	не идентифицировано
0,83-0,85	3 β -гидрокси-ланоста-8,24-диен (ланостерол)
0,77	не идентифицировано
0,72-0,73	3 β ,22-дигидрокси-ланоста-8,24-диен (инотодиол), 3 β -гидрокси-ланоста-8,24-диеновая-21-кислота (траметеноловая кислота)
0,70-0,71	не идентифицировано
0,61-0,63	не идентифицировано
0,54-0,58	21,24-циклопента-ланоста-3 β ,21,25-триол-8-ен
0,45-0,47	3 β -гидрокси-8,24-диен-ланоста-21,23-лактон
0,37-0,38	не идентифицировано

* - Y. Shin [and others] //Journal of Wood Science. - 2001. - V.47, I. 4. - P.313-316.

Спектрофотометрическим методом было определено количество стериновых соединений во фракциях липофильных веществ, выделенных из водных экстрактов чаги (Антипов Л.В. Физические методы контроля сырья и продуктов в мясной промышленности. - СПб.: ГИОРД, 2006. - 200 с.). Показано, что в зависимости от используемой партии сырья их содержание составляет 2,83-9,90 мас.% от экстрактивных веществ фракций.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет извлечь из чаги фракцию липофильных веществ, включающих стериновые соединения, обладающие выраженной биологической активностью. Необходимо отметить, что на получение фракции липофильных веществ, включающих стериновые соединения, не оказывают влияние выбор партии сырья, а также способ получения водного экстракта чаги. Фракция липофильных веществ, полученная предлагаемым способом, может быть использована для разработки биологически активных добавок и лекарственных препаратов различной направленности действия.

Формула изобретения

Способ получения фракции липофильных веществ из чаги, включающий осаждение меланина путем добавления к водному экстракту чаги водного раствора хлористоводородной кислоты до pH 1,5-2,0, удаление фильтрата, экстрагирование меланина органическим растворителем, отделение экстракта и удаление растворителя, отличающийся тем, что меланин экстрагируют петролейным эфиром при перемешивании до получения смеси однородной консистенции, причем массовое соотношение меланин: петролейный эфир составляет 1:5, затем смесь замораживают, а слой органического

экстракта отделяют после размораживания смеси.

5

10

15

20

25

30

35

40

45