



(51) МПК  
**A61K 36/88** (2006.01)  
**A61K 31/352** (2006.01)  
**B01D 11/02** (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010141321/15, 07.10.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 07.10.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.10.2010

(45) Опубликовано: 10.11.2011 Бюл. № 31

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Jeffrey B. Harborne. Flavonoid sulphates: a new class of sulphur compounds in higher plants // Phytochemistry, 1975, vol.14, p.1147-1155. Kim J.H. et all. Antioxidants and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 expression from leaves of Zostera marina L. // Arch Pharm Res. 2004 Feb; 27 (2): 177-83, PMID: 15022719. WO 2005087243 A1, 22.09.2005.**

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100 лет Владивостоку, 159, Учреждение Российской академии наук Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, зав. патентным отделом, Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

**Артюков Александр Алексеевич (RU),  
 Кочергина Татьяна Юрьевна (RU),  
 Рудцова Татьяна Анатольевна (RU),  
 Купера Елена Владимировна (RU),  
 Новиков Вячеслав Леонидович (RU),  
 Глазунов Валерий Петрович (RU),  
 Маханьков Вячеслав Валентинович (RU),  
 Козловская Эмма Павловна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ  
 АКАДЕМИИ НАУК ТИХООКЕАНСКИЙ  
 ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ  
 ХИМИИ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО  
 ОТДЕЛЕНИЯ РАН (ТИБОХ ДВО РАН)  
 (RU)**

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ 7,3'-ДИСУЛЬФАТА ЛЮТЕОЛИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, в частности к получению 7,3'-дисульфата лютеолина. Способ получения 7,3'-дисульфата лютеолина путем экстракции морской травы семейства Zosteraceae этиловым спиртом при определенных условиях, экстракт упаривают, полученный концентрат растворяют в дистиллированной воде, фильтруют или центрифугируют, фильтрат подкисляют

соляной кислотой, отстаивают сутки, осадок удаляют, затем раствор наносят на колонку с полихромом-1, сорбент промывают дистиллированной водой, а целевой продукт элюируют водным раствором этилового спирта, затем из элюата удаляют спирт, целевой продукт сушат на распылительной или лиофильной сушке. Способ позволяет расширить спектр биологически активных веществ из доступного, широко распространенного морского сырья. 1 ил.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.  
*A61K 36/88* (2006.01)  
*A61K 31/352* (2006.01)  
*B01D 11/02* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010141321/15, 07.10.2010**

(24) Effective date for property rights:  
**07.10.2010**

Priority:

(22) Date of filing: **07.10.2010**

(45) Date of publication: **10.11.2011 Bull. 31**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let  
Vladivostoku, 159, Uchrezhdenie Rossijskoj  
akademii nauk Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav.  
patentnym otdelom, N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Artjukov Aleksandr Alekseevich (RU),  
Kochergina Tat'jana Jur'evna (RU),  
Rutskova Tat'jana Anatol'evna (RU),  
Kupera Elena Vladimirovna (RU),  
Novikov Vjacheslav Leonidovich (RU),  
Glazunov Valerij Petrovich (RU),  
Makhan'kov Vjacheslav Valentinovich (RU),  
Kozlovskaja Ehmma Pavlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**UChREZhDENIE ROSSIJSKOJ AKADEMII  
NAUK TIKHOOKEANSKIJ INSTITUT  
BIOORGANICHESKOJ KHIMII  
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJa RAN  
(TIBOKh DVO RAN) (RU)**

**(54) METHOD OF OBTAINING LUTEOLYN 7,3'-DISULPHATE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to pharmaceutical industry, in particular to obtaining luteolin 7,3'-disulphate. Method of obtaining luteolin 7,3'-disulphate, by extraction of sea grass of family Zosteraceae by ethylene at defined conditions, extract is evaporated, obtained concentrate is solved in distilled water, filtered or centrifuged, filtrate is acidified by hydrochloric

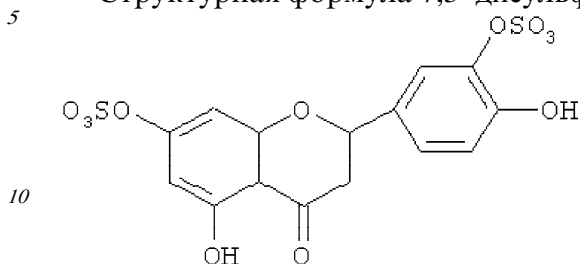
acid, stood for a day, sediment is removed, then solution is applied on column with polychrome-1, sorbent is washed with distilled water, and target product is eluted with water solution of ethylene, then alcohol is removed from eluate, target product is dried on spray-type or lyophilic dryer.

EFFECT: method makes it possible to extend spectrum of biologically active substances from available, common sea raw material.

1 dwg, 2 ex

Изобретение относится к фармакологическому производству и может быть использовано для получения биологически активных веществ из морских трав семейства *Zosteraceae*, в частности для получения 7,3'-дисульфата лютеолина.

Структурная формула 7,3'-дисульфата лютеолина:



15 Сульфаты лютеолина широко распространены в высших наземных растениях. В то же время среди морских растений они обнаружены только в морских травах семейства *Zosteraceae* (*Zostera marina* и *Z. Asiatica*) [Harborne J.B. // *Phytochemistry* 1975, vol.14, p.1147-1155] и в морской траве *Thalassia testudinum* [Jensen P.R., Jenkins K.M. et al. // *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, vol.64, №4, p.1490-1496]. Известно, что водонерастворимый лютеолин, поступающий с пищей в организм человека, проходит

20 ряд модификаций как эпителиальными клетками кишечника, так и клетками печени, где они превращаются в такие водорастворимые метаболиты, как глюкоурониды, сульфаты и гликозиды [Gradolatto A. et al // *Drug, Metabolism and Disposition*, 2004, vol. 32, p.58-64]. В виде этих производных лютеолин циркулирует в плазме крови и проникает в различные клетки тканей человека, где выполняет ряд функций.

25 Медико-биологическая активность сульфопроизводных лютеолина достаточно обширна. В отличие от лютеолина они наиболее полно и легко усваиваются организмом.

30 Известна антиоксидантная активность производных лютеолина [Lopez-Lazaro M. // *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, 2009, vol.9, p.31-59. T.], обуславливающая солнцезащитные и противоожоговые свойства экстрактов зостеры [Kim J.H., Cho Y.H. et al. // *Arch. Pharm. Res.*, 2004, vol. 27, №2, p.177-183], антибиотическая и противовирусная активность [Jensen P.R., Jenkins K.M. et al. // *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, vol.64, №4, p.1490-1496, Lopez-Lazaro M. // *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, 2009, vol.9, p.31-59. T.], противоопухолевая [Lopez-Lazaro M. // *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, 2009, vol.9, p.31-59. T.], кардиоваскулярная, противодиабетическая, антиаллергическая, противовоспалительная и иммуномодулирующая активности [Lopez-Lazaro M. // *Mini-Reviews in Medical Chemistry*, 2009, vol.9, p.31-59. T.].

40 Дисульфат лютеолина - это природная водорастворимая форма лютеолина, способная проникать в плазму крови человека через кишечник, минуя стадии модификации клетками кишечника и печени. Это позволяет создавать наивысшую концентрацию лютеолина в крови человека, повышая эффективность ее физиологического действия.

45 Известны способы получения лютеолина и его производных, в том числе сульфопроизводных, из высших растений и их частей.

50 Известен способ получения лютеолина из морской травы *Zostera marina* L. путем экстракции высушенных листьев морской травы 70% водным этиловым спиртом, упаривания, суспендирования сухого остатка в воде, фракционирования суспензии гексаном, дихлорэтаном, этилацетатом и бутанолом последовательно, хроматографирования этилацетатного экстракта на сефадексе LH-20 градиентом 40-100% метанола с последующим упариванием элюата и кристаллизацией лютеолина из

метанола [Kim J.H., Cho Y.H. et al. // Arch. Pharm. Res., 2004, vol.27, №2, p.177-183]. При выделении лютеолина используется много пожароопасных (гексан, этилацетат, бутанол) и токсичных (метанол, дихлорэтан) растворителей.

Известен способ получения лютеолин 7-О-β-D-глюкокопиранозил-2''-сульфата из морской травы *Thalassia testudinum* путем экстракции зеленой массы, разбавления экстракта водой, гомогенизирования, упаривания, растворения сухого остатка в метаноле, упаривания, распределения сухого остатка между водой и этилацетатом, высушивания водной фракции, растворения сухого остатка в метаноле, хроматографирования на сефадексе LH-20 в метаноле и последующей ВЭЖХ (в системе 40% MeOH - H<sub>2</sub>O - 0,1% трифторуксусная кислота) [Jensen P.R., Jenkins K.M. et al. // Applied and Environmental Microbiology, 1998, vol.64, №4, p.1490-1496]. Способ разработан для лабораторных исследований методом ВЭЖХ и для производственных целей непригоден.

Известен способ получения лютеолин 3'-сульфата из листьев *Lahenallia unifolia* путем экстракции сырья горячим 80% метанолом и выделения сульфатов флавонов на Watman №3 (ватмане) с последующей идентификацией по R<sub>f</sub>, УФ-спектральному анализу и электрофорезу [Williams C.A., Harborne J.B. // Phytochemistry, 1976, vol.15, p.349-350]. Способ разработан для наземных растений; при выделении целевого продукта используется высокотоксичный кипящий метанол; способ лабораторный, с выделением целевого продукта методом бумажной хроматографии.

Известен способ получения флавоноидных гликозидов (диосметин, диосметин-7-О-глюкозид и лютеолин-7-О-глюкозид) из морской травы *Z. marina* путем трехкратной экстракции этанолом, концентрирования, разбавления водой, последовательной экстракции гексаном, дихлорэтаном и бутанолом, обработки этилацетатного экстракта на силикагельной колонке градиентом метанола в дихлорэтаноле с последующим исследованием полученных флавоноидных гликозидов методом масс-спектрометрии и газовой хроматографии [Т.Мilkova, R.Petkova, et al. // Botanica Marina, 1995, vol.38, p.99-101]. Способ разработан для выделения гликозидов флавоноидов, при выделении которых используются пожароопасные экстрагенты (этилацетат, бутанол).

Известны лабораторные методы обнаружения и идентификации сульфатов флавоноидов, в том числе и 7,3'-дисульфата лютеолина посредством двумерной тонкослойной хроматографии на целлюлозе и электрофореза на бумаге в кислых условиях [Harborne J.B. // Phytochemistry, 1975, vol.14, p.1147-1155].

В доступной научно-технической и патентной литературе способы получения 7,3'-дисульфата лютеолина из морских трав или других видов растений не обнаружены.

Задачей изобретения является разработка способа получения 7,3'-дисульфата лютеолина из морских трав семейства *Zosteraceae*.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в расширении спектра биологически активных веществ из доступного, широко распространенного морского сырья.

Заявляемый способ получения 7,3'-дисульфата лютеолина заключается в следующем.

Свежескошенную зеленую морскую траву семейства *Zosteraceae* или зеленые штормовые выбросы этой травы опресняют питьевой водой, удаляют механические примеси, водоросли и другие виды морских растений. Зостеру промывают трижды, затем помещают на сетчатый фильтр до полного стекания воды. После этого зостеру загружают в реактор под гнетом во избежание всплытия травы и заливают «под зеркало» 96% этиловым спиртом при соотношении сырье : экстрагент 1:(1-2),

экстракцию осуществляют в течение 12-24 часов. Спиртовый экстракт сливают, фильтруют через тканевый, бумажный или ватный фильтр. Процесс повторяют трехкратно. Спиртовые экстракты объединяют и упаривают в вакууме. Полученный концентрат растворяют в воде. Раствор центрифугируют или фильтруют. Осадок удаляют. Фильтрат подкисляют 15-20% соляной кислотой до pH 1-2 и оставляют на сутки при температуре 2-4°C для образования кислотонерастворимого осадка лигнина. Осадок отделяют центрифугированием или фильтрованием.

Кислый раствор фенольных соединений наносят на колонку с полихромом-1, уравновешенным дистиллированной водой. Полифенольные соединения связываются с полихромом-1. Минеральные соли и соляную кислоту удаляют путем промывания дистиллированной водой. Элюирование полифенольных соединений осуществляют градиентом этилового спирта. Наиболее полярный полифенол 7,3'-дисульфат лютеолина элюируют 5% водным раствором этанола. Водно-спиртовый элюат упаривают в вакууме при 60°C до полного удаления спирта и высушивают водный остаток на лиофильной или распылительной сушке.

Для подтверждения чистоты продукта проведен анализ образцов 7,3'-дисульфата лютеолина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

ВЭЖХ проводили на хроматографе "LaChrom" (Merck Hitachi), снабженном УФ детектором L-7400, насосом L-7100, термостатом L-7300, интегратором D-7500 и колонкой Agilent Technologies Zorbax Eclipse XDB-C18, 3.5 мк (75 мм×4.6 мм) с защитной колонкой Hypersil ODS, 5 мк (4.0 мм×4.0 мм). Колонку термостатировали при 30°C. Разделение примесей проводили смесью растворителей: А (вода+1% ледяной уксусной кислоты) и В (ацетонитрил+1% ледяной уксусной кислоты) в следующем режиме: 0-5 мин - изократический, 90% А, 10% В; 5-35 мин градиентный, 90-10% А, 10-90% В. Скорость подачи растворителей 1 мл/мин. Детектирование проводили при 270 нм.

На чертеже представлена ВЭЖ хроматограмма 7,3'-дисульфата лютеолина, выделенного из *Zostera marina*.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

#### Пример 1

Сырье - свежескошенную траву zostery (*Z. marina*) в количестве 10 кг очищают от посторонних примесей (других растений, водорослей, механических примесей) и опресняют питьевой водой. Промывку травы водой производят трижды (по 10 л), причем последний раз траву замачивают в воде на 8 часов. Затем сырье помещают на сетчатый фильтр до полного стекания воды.

После этого zostery загружают в реактор, прижимают решеткой из нержавеющей стали во избежание всплывания и заливают «под зеркало» 10 л 96% этилового спирта. Экстракцию осуществляют в течение 12 часов при температуре окружающей среды (20-23°C). После этого этанольный экстракт сливают и фильтруют через бумажный фильтр. Процесс повторяют трижды. Полученные экстракты объединяют и упаривают в вакууме при 60°C.

Концентрат в количестве 0,56 кг растворяют в 2 л дистиллированной воды. Полученный раствор центрифугируют, осадок удаляют. Супернатант подкисляют 15% соляной кислотой до pH 1-2. Кислый раствор оставляют на сутки при температуре 2°C для образования кислотонерастворимого осадка. Затем осадок отделяют центрифугированием.

Кислый раствор фенольных соединений пропускают через колонку с 0,3 кг сорбента полихром-1, уравновешенного дистиллированной водой. Промывают колонку 1,5 л дистиллированной воды для удаления минеральных солей и соляной

кислоты. Элюирование адсорбированного 7,3'-дисульфата лютеолина осуществляют 0,5 л 5% водного раствора этилового спирта. Элюат упаривают в вакууме до полного удаления спирта при 60°C. Водный остаток лиофилизуют. Получают 4,0 г 7,3'-дисульфата лютеолина.

#### Пример 2

Свежесобранные выбросы морской травы zostеры (*Zostera* sp.) в количестве 100 кг очищают от водорослей и механических примесей и трижды промывают питьевой водой, причем последний раз трава замачивается на 12 часов. Затем сырье помещают на сетчатый фильтр до полного стекания воды.

После этого сырье загружают в реактор, предварительно измельчив траву на траворезке. Траву прижимают инертным грузом во избежание всплывания и заливают «под зеркало» 150 л 96% этилового спирта. Экстракцию осуществляют в течение 24 часов при температуре (18-25°C). После этого этанольный экстракт сливают и фильтруют через тканевый фильтр. Процесс повторяют трижды. Экстракты объединяют и упаривают при 60°C под вакуумом.

Полученный концентрат в количестве 5,06 кг растворяют в 20 л дистиллированной воды. Раствор отфильтровывают. Фильтрат подкисляют 130 мл 20% соляной кислотой до pH 1-2 и оставляют на сутки при температуре 4°C для образования кислотонерастворимого осадка. Выпавший осадок отделяют на фильтре.

Кислый раствор фенольных соединений пропускают через колонку с 3 кг сорбента полихром-1, уравновешенного дистиллированной водой. Колонку с адсорбированными полифенольными соединениями отмывают от минеральных солей и соляной кислоты 12 л дистиллированной воды. Целевой продукт элюируют 3 л 5% водного раствора этилового спирта. Элюат упаривают до полного удаления спирта при 60°C. Водный остаток сушат на распылительной сушилке. Получают 38,0 г 7,3'-дисульфата лютеолина.

#### Формула изобретения

Способ получения 7,3'-дисульфата лютеолина, заключающийся в том, что морскую траву семейства Zosteraceae подвергают экстракции 96% этиловым спиртом в течение 12-24 ч при соотношении сырье:экстрагент 1:(1-2), экстракт упаривают, затем полученный концентрат растворяют в дистиллированной воде, фильтруют или центрифугируют, далее фильтрат подкисляют 15-20% соляной кислотой до pH 1-2, отстаивают сутки при температуре 2-4°C, осадок удаляют, затем раствор наносят на колонку с полихромом-1, далее сорбент промывают дистиллированной водой, а целевой продукт элюируют 5%-ным водным раствором этилового спирта, затем из элюата удаляют спирт предпочтительно при 60°C в вакууме, далее целевой продукт сушат на распылительной или лиофильной сушилке.

