



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **69107**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 30/02 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 10058**

(22) Дата подання заявки: **15.08.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.04.2012**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.04.2012, Бюл.№ 8**

(72) Винахідник(и):

**Марченко Михайло Маркович (UA),
Шелифіст Антоніна Євгенівна (UA),
Чебан Лариса Миколаївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА,
вул. М. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
(UA)**

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ СЕСКВІТЕРПЕНОВИХ ЛАКТОНІВ ІЗ ЛИСТКІВ SAUSSUREA DISCOLOR (WILLD.) DC

(57) Реферат:

Спосіб отримання сесквітерпенових лактонів із листків *Saussurea discolor* (Willd.) DC включає екстракцію суми сесквілактонів (смолки), очищення її за допомогою адсорбційної хроматографії на колонці та препаративну тонкошарову хроматографію. Екстрагування суми лактонів із листків *S. discolor* здійснюють хлороформом. Елююють сесквілактони при адсорбційній хроматографії на колонці сумішшю петролейний ефір/хетилацетат. Препаративну хроматографію проводять висхідним способом у системі розчинників петролейний ефір/хетилацетат. Як проявник використовують ванілін, а вилучення індивідуальних компонентів із носія здійснюють бензолом.

UA 69107 U

Корисна модель належить до біотехнології і може бути використана для отримання очищеної суми та індивідуальних компонентів сесквітерпенових лактонів - перспективних фармакологічних сполук, що мають виражену антимікробну, протизапальну та протипухлинну дію.

Відомий спосіб отримання сесквітерпенових лактонів із листків рослин, що ґрунтується на їх поступовій екстракції водою та хлороформом з подальшим очищенням отриманої смолки (суми сесквілактонів) за допомогою адсорбційної хроматографії на колонці (Рыбалко К. С. Природные сесквитерпеновые лактоны. - М.: Медицина, 1978. - 320 с). Однак недоліком даного способу є обробка рослинної сировини органічними розчинниками при високій температурі, що призводить до значної втрати сесквілактонів за рахунок летючості їх сполук.

Найбільш близьким є спосіб отримання алантолактону із коренів і кореневищ оману високого (Беляков К. В., Попов Д. М. Получение алантолактона стандартного образца // Фармация. - 2004. - № 1. - С. 37-39), відповідно до якого виділення суми сесквілактонів проводили на колонці і елюювали сумішшю петролейний ефір×етилацетат (9×1), виділення компонентів сесквілактонів проводили методом препаративної тонкошарової хроматографії (ТШХ) на силуфолових пластинках в системі розчинників бензол-етилацетат-метанол (94×3×0,5), індивідуальні компоненти детектували при нагріванні 20 % H_2SO_4 , а екстракцію отриманих фракцій проводили сумішшю петролейний ефір×етилацетат (9×1). Недоліком даного способу є використання як розчинників високотоксичних сполук та значне пошкодження хроматографічних пластинок при проявленні їх сірчаною кислотою.

Технічний результат полягає в підвищенні виходу суми сесквітерпенових лактонів, очищенні її від супутніх речовин та розробці ефективної методики отримання індивідуальних компонентів.

Суть корисної моделі полягає в тому, що спосіб отримання сесквітерпенових лактонів виду *S. discolor* включає екстракцію суми сесквілактонів (смолки), очищення її за допомогою адсорбційної хроматографії на колонці та препаративну ТШХ, екстрагування суми лактонів із листків *S. discolor* здійснювали хлороформом при кімнатній температурі 21 ± 1 °C протягом 5-ти діб, очищення смолки проводили за допомогою адсорбційної хроматографії на колонці, де як елюват використовували суміш петролейний ефір×етилацетат (9×1), препаративну хроматографію проводили висхідним способом у системі розчинників петролейний ефір×етилацетат (9×1), проявлення хроматограм проводили 1 % ваніліном у 20 % H_2SO_4 при нагріванні до 120 ± 5 °C, а вилучення індивідуальних компонентів із носія проводили бензолом.

Від типу розчинника, що застосовується для екстракції, залежить не тільки повнота вилучення досліджуваних сполук, але і їх якісний склад. Сесквітерпенові лактони належать до сполук, здатних змінювати структуру у процесі нагрівання, що проявляється у їх хімічних перетвореннях та руйнуванні лактонного кільця. Тому нами розроблені умови екстракції сесквілактонів листків *S. discolor*, що включали тривалу (близько 5 діб) хлороформну екстракцію при температурі 21 ± 1 °C.

Застосування системи розчинників петролейний ефір×етилацетат у співвідношенні 9×1 дозволяє вичерпно вимивати сесквітерпенові лактони із носія при адсорбційній хроматографії.

Використання як проявника 1 % ваніліну у 20 % H_2SO_4 при нагріванні до 120 ± 5 °C дозволяє якісно детектувати сесквітерпенові лактони на хроматограмах та зберегти цілість носія хроматографічних пластинок.

Як екстрагент при вилученні індивідуальних компонентів із носія доцільно використовувати бензол, що дозволяє провести вичерпну екстракцію індивідуальних сесквітерпенових лактонів.

Спосіб дозволяє підвищити вихід суми сесквілактонів (смолки) та провести якісний розподіл їх індивідуальних компонентів.

На фіг. 1 приведено ТШХ листків дикорослих рослин *S. discolor* за умов водно-хлороформної екстракції.

На фіг. 2 приведено ТШХ листків дикорослих рослин *S. discolor* за умов хлороформної екстракції.

Спосіб здійснюють наступним чином. Аналітичну пробу надземної вегетативної частини рослинної сировини (листіків) подрібнюють до розмірів частинок, що проходять через сито з діаметром отворів 0,5 мм. Наважку сухої подрібненої речовини переносять в колбу з притертим корком, заливають хлороформом у співвідношенні 1×10 і настоюють протягом 5 днів. Отриманий екстракт фільтрують і випарюють досуха у випарювальній чашці. Осад повторно розчиняють, додаючи 0,5-1 мл хлороформу. Отримують в'язкий темно-зелений осад - смолку, яка є сумішшю екстрагованих хлороформом сесквітерпенових лактонів. Для очищення отриманих смолук залучають адсорбційну хроматографію на колонці. Як сорбент використовують силікагель. Колонка для адсорбційної хроматографії являє собою скляну трубку з відтягнутим нижнім кінцем або бюретку, завдовжки 15 см та діаметром 8-12 мм. Колонка

заповнюється дрібним сухим порошком адсорбенту або його суспензією в тому розчиннику, який буде використаний для хроматографії. Після заповнення колонки розчинником на нерухому фазу наноситься невеликий об'єм зразка з таким розрахунком, щоб він пройшов у верхній шар (завантаження колонки). Рухомою фазою виступає суміш петролейний ефір×етилацетат (9×1). Елюват з колонки збирають порціями по 5 мл. Присутність у фракціях сесквітерпенових лактонів перевіряють на СФ при 214 нм. Порції, у яких присутні сесквілактони, об'єднують, залишки розчинника відганяють під вакуумом. Отримані концентровані витяжки аналізують методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту (ТШХ) на пластинках "Silufol - UV-254" (Чехія) в системі розчинників висхідним способом. Як розчинник використовують суміш петролейний ефір×етилацетат (9×1). Стінки хроматографічної камери вистилають фільтрувальним папером та насичують камеру рухомою фазою протягом 1 год. при температурі 20-25 °С. Хроматографічні пластинки попередньо активують у термостаті протягом 1 год. при температурі 105 °С. Об'єм розчину досліджуваної витяжки наносять невеликими порціями, одержуючи суцільні смуги. Після випаровування розчинників з нанесеної проби пластинку поміщають у насичену розчинниками хроматографічну камеру, якомога більш вертикально, стежачи за тим, щоб лінія старту знаходилась вище поверхні рухомої фази. Камеру закривають, залишають її при температурі від 20 до 25 °С у захищеному від прямих сонячних променів місці. Після того, як рухома фаза пройде відстань у 10-15 см, пластинку виймають, відмічають положення фронту розчинника, сушать. Надалі від хроматографічної пластинки відрізають смужку шириною 0,5 см вздовж напрямку проходження розчинника, обприскують 1 % ваніліном у 20 % H_2SO_4 та проводять візуалізацію. Забарвлену смужку прикладають до хроматографічної пластинки і відмічають місцезнаходження проявлених речовин. Зони, що відповідають індивідуальним сполукам, зіскрібають із носія та екстрагують бензолом.

Сесквітерпенові лактони - кисневмісні похідні сесквітерпеноїдів, різноманітність у межах одного типу яких залежить від ступеня насиченості кілець, розташування подвійних зв'язків і наявності різних функціональних груп. Така різноякісність значно ускладнює процес виділення та ідентифікації сесквілактонів і вимагає індивідуального підбору методів та умов виділення досліджуваних сполук. У зв'язку з цим, нами були апробовані різні шляхи екстракції, що відрізнялися як за екстрагуючою речовиною, так і за температурним режимом. При апробації двох схем екстракції нами встановлені відмінності у частці виходу смолوک. Так, за водно-хлороформної екстракції рослинної сировини вихід смолки сесквілактонів становив $1,33 \pm 0,13$ % (при відстоюванні збільшувався до $3,32 \pm 0,33$ %), тоді як за умов тривалої хлороформної екстракції (близько 5 діб) - $7,89 \pm 0,43$ %.

Отримані після екстракції смолки (сума сесквілактонів) надалі очищували на колонці, заповненій силікагелем з використанням системи розчинників, за основу приготування яких взятий петролейний ефір. Були апробовані системи розчинників на основі петролейного ефіру та етилацетату у співвідношеннях 9,5:0,5, 9:1, 8,5:1,5, 8:2 і так далі. Проби аналізували на предмет наявності поглинання, характерного для сесквітерпенових лактонів, при довжині хвилі 214 нм. Було з'ясовано, що вже при використанні першої системи розчинників 9:1 із носія вимиваються майже всі сполуки лактонної природи. На основі спектрального аналізу елюватів встановлено, що їх вилучення відбувається у два етапи. При використанні наступної системи розчинників із носія вимивається решта компонентів, що становить незначну частку досліджуваного зразка. Слід зауважити, що спектральна активність цих елюватів була значно нижчою, у порівнянні із такими ж у попередніх фракціях. При використанні як рухомої фази системи розчинників у співвідношенні 8:2 та всіх інших наступних розведень сполуки, що мають спектральну активність при 214 нм, з колонки не вимивалися.

Після об'єднання, концентрування всіх елюватів, що мали спектральну активність, зразки аналізували за допомогою ТШХ.

Як рухому фазу при ТШХ використовували суміш петролейний ефір×етилацетат (9×1) та бензол×етилацетат×метанол (94×3×0,5) (найближчий аналог). Нами була визначена суміш петролейного ефіру×етилацетату як оптимальний розчинник для смолوک *S. discolor*.

В результаті тонкошарової хроматографії смолки експлантатів *S. discolor*, отриманої шляхом водної екстракції при 70 °С і з наступною обробкою хлороформом, було ідентифіковано чотири компоненти, що за специфічним забарвленням можна віднести до сполук лактонної природи (фіг. 1). При застосуванні такої схеми екстракції не враховується втрата лактонів за рахунок летючості їхніх сполук та руйнування лактонного кільця під час нагрівання. Тому паралельно проводили екстракцію із залученням методу, що виключає використання підвищеної температури. Співвідношення рослинної сировини та екстрагенту змінювали від 1×5 до 1×10 у зв'язку із сильною опушеністю рослинного матеріалу, що перешкоджало його якісному змочуванню екстрагуючою речовиною.

Як показали отримані результати, у випадку уникнення при екстракції сесквілактонів етапу обробки при підвищених температурах спектр речовин, що виявляються на хроматограмах, є набагато різноманітнішим (фіг. 2).

Відомо, що сесквітерпенові лактони мають здатність набувати фіолетового та рожево-фіолетового забарвлення, за дії специфічних речовин (20 % H_2SO_4 (найближчий аналог), концентрована H_2SO_4 , 1 % розчин ваніліну у концентрованій H_2SO_4 , а також $KMnO_4$, який має здатність взаємодіяти ще й з кумаринами). В зв'язку з цим, нами були апробовані всі схеми, в основі яких лежить використання H_2SO_4 . Нами також був застосований 20 % розчин H_2SO_4 , що містив 1 % ванілін. Як виявилось, саме при використанні останнього на хроматографах проявлялася максимальна кількість смуг з відповідним забарвленням, а також зберігалась цілісність носія хроматографічних пластинок.

Отже, на основі проведених досліджень було підібрано умови для проведення хроматографічного розподілу сесквітерпенових лактонів для листків *S. discolor* (табл. 1).

Таблиця 1

Схема отримання сесквітерпенових лактонів *S. discolor*

Етап	Реагент	Умови обробки
Екстракція	Хлороформ	П'ять днів при температурі 21 ± 2 °C
ТШХ	Петролейний ефір×етилацетат, 9×1	21 ± 2 °C
Ідентифікація	1 % ванілін у 20 % H_2SO_4	Витримування при 120 °C, 5 хв.

Розроблена схема надалі була використана для аналізу суми лактонів різних зразків *S. discolor*.

Так, у природному зразку (листки) *S. discolor* виявили 9 сполук (табл. 2), що відрізнялися за коефіцієнтом рухливості та характеризувалися відмінною інтенсивністю забарвлення.

Таблиця 2

Коефіцієнти рухливості компонентів сесквітерпенових лактонів листків *S. discolor*

Матеріал	Коефіцієнт рухливості								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Дикорослі рослини	0,14	0,26	0,36	0,43	0,53	0,65	0,75	0,90	0,95

Кількість сесквілактонів в сумарному препараті з листків *S. discolor* складає 4,57 мг/г сухої сировини. Максимальним забарвленням на хроматограмах характеризуються компоненти з коефіцієнтом рухливості 0,36 та 0,95. Для них встановлено найвищий вміст речовини у фракціях - $1,17 \pm 0,032$ та $0,98 \pm 0,017$ відповідно.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб отримання сесквітерпенових лактонів із листків *Saussurea discolor* (Willd.) DC, що включає екстракцію суми сесквілактонів (смолки), очищення її за допомогою адсорбційної хроматографії на колонці та препаративну тонкошарову хроматографію (ТШХ), який **відрізняється** тим, що екстрагування суми лактонів із листків *S. discolor* здійснюють хлороформом при кімнатній температурі 21 ± 1 °C протягом 5-ти діб, елююють сесквілактони при адсорбційній хроматографії на колонці сумішшю петролейний ефір× етилацетат (9×1), препаративну хроматографію проводять висхідним способом у системі розчинників петролейний ефір×етилацетат (9×1), як проявник використовують 1 % ванілін у 20 % H_2SO_4 при нагріванні до 120 ± 5 °C, а вилучення індивідуальних компонентів із носія здійснюють бензолом.

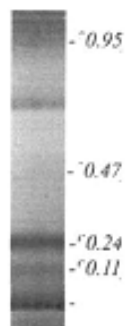


Fig. 1

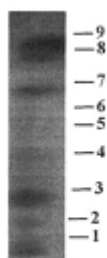


Fig. 2

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601