



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 36/38 (2020.02); B01D 11/02 (2020.02); A61K 2121/00 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019130766, 30.09.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.09.2019Дата регистрации:
30.04.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.09.2019

(45) Опубликовано: 30.04.2020 Бюл. № 13

Адрес для переписки:

308015, г. Белгород, ул. Победы, 85, НИУ
"БелГУ", ОИС, Цурикова Наталья Дмитриевна

(72) Автор(ы):

Бойко Николай Николаевич (UA),
Жилякова Елена Теодоровна (RU),
Малютина Анастасия Юрьевна (RU),
Папонов Борис Владимирович (UA),
Новиков Олег Олегович (RU),
Писарев Дмитрий Иванович (RU),
Мизина Прасковья Георгиевна (RU),
Коваленко Анатолий Михайлович (RU),
Ткачев Александр Владимирович (UA),
Рябых Александр Андреевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ROMPP H et al. Enrichment of
hyperforin from St.John,s wort (*Hypericum
perforatum*) by pilot-scale supercritical carbon
dioxide extraction //Eur J Pharm Sci, 2004 Mar,
21(4):443-51. COSSUTA DANIEL et al. Extraction
of hyperforin and hypericin from st. John,s Wort
(*Hypericum perforatum* L.) with different
solvents //J.of Food Process Engineering, (см.
прод.)

(54) Способ выделения гиперфорина и адгиперфорина из травы зверобоя продырявленного

(57) Реферат:

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, а именно к способу выделения гиперфорина и адгиперфорина из травы зверобоя продырявленного. Способ включает измельчение травы зверобоя продырявленного, экстрагирование измельченного сырья органическим растворителем, упаривание растворителя, в качестве органического растворителя используют легко кипящую жидкость - метиловый эфир

перфторбутана при соотношении сырья/растворитель 1:4,5-9,0 масс./масс., экстрагирование сырья осуществляют методом циркуляции растворителя в течение 1-3 часов, полученный экстракт упаривают. Изобретение позволяет выделить гиперфорин и адгиперфорин из измельченной травы зверобоя продырявленного с помощью метилового эфира перфторбутана (Novac 7100) при минимальных энергозатратах, обычном давлении, с



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 36/38 (2006.01)
B01D 11/02 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 36/38 (2020.02); B01D 11/02 (2020.02); A61K 2121/00 (2020.02)(21)(22) Application: **2019130766, 30.09.2019**(24) Effective date for property rights:
30.09.2019Registration date:
30.04.2020

Priority:

(22) Date of filing: **30.09.2019**(45) Date of publication: **30.04.2020** Bull. № 13

Mail address:

**308015, g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU",
OIS, Tsurikova Natalya Dmitrievna**

(72) Inventor(s):

**Boiko Nikolai Nikolaevich (UA),
Zhiliakova Elena Teodorovna (RU),
Maliutina Anastasiia Iurevna (RU),
Paponov Boris Vladimirovich (UA),
Novikov Oleg Olegovich (RU),
Pisarev Dmitrii Ivanovich (RU),
Mizina Praskovia Georgievna (RU),
Kovalenko Anatolii Mikhailovich (RU),
Tkachev Aleksandr Vladimirovich (UA),
Riabykh Aleksandr Andreevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Belgorodskii gosudarstvennyi
natsionalnyi issledovatel'skii universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD FOR EXTRACTING HYPERFORIN AND ADHYPERFORIN FROM ST_ JOHN'S WORT HERB**

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to chemical-pharmaceutical industry, namely to a method for extracting hyperforin and adhyperforin from St. John's wort herb. Method comprises grinding common St. John's wort herb, extraction of ground raw material with organic solvent, evaporation of solvent, organic liquid used is an easily boiling liquid – perfluorobutane methyl ester with raw material/solvent ratio of 1:4.5–9.0 wt/wt; extraction of the raw material is carried out by

solvent circulation for 1–3 hours; the obtained extract is evaporated.

EFFECT: invention enables to isolate hyperforin and adhyperforine from ground St_ John's wort herb with perfluorobutane methyl ester (Novec 7100) at minimum power inputs, normal pressure, using standard equipment specific for chemical-pharmaceutical and/or essential oil-producing enterprises using environmentally safe technology.

1 cl, 4 dwg, 2 tbl, 3 ex

C 1
7
5
4
0
2
7
2
R U

R U
2
7
2
0
4
5
7
C 1

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и может быть использовано для выделения гиперфорина и адгиперфорина из травы зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.), семейства зверобойных (Hypericaceae).

В настоящее время в литературе описано несколько различных способов выделения производных флороглюцина (гиперфорина и адгиперфорина) из травы зверобоя продырявленного - экстракция с помощью органических растворителей и сжиженных газов (Cossuta D., Vatai T., **Báthori M.**, Hohmann J., Keve T., **Simándi B.** (2011). Extraction of hyperforin and hypericin from st. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) with different solvents. *Journal of Food Process Engineering*, 35(2), 222-235 (doi: 10.1111/j. 1745-4530.2010.00583.x).

Известен способ получения экстракта из травы зверобоя продырявленного с помощью хладона 227 ea (Dowdle P.A., Merseyside S.S.H., Corr S., Cheshire A., Harris H., Cheshire W. Solvent extraction process. Patent US 2004/0105899 A1. A61K 35/78. Pub. Date: Jun.3, 2004). Данный способ предполагает экстракцию травы зверобоя продырявленного в специальной установке в течение 4 часов, с помощью сжиженного газа хладона 227 ea при давлении 15 атм., и температуре 50°C. При этом, достигается количественный выход желтого смолоподобного продукта 2,4%.

Однако для этого способа требуется оборудование, которое должно работать под избыточным давлением более 15 атм. Другой недостаток данного способа это необходимость затраты энергии на операции упаривания экстракта и на операции конденсации паров растворителя в холодильной установке. Еще один недостаток данного способа это применение фреона с высоким значением потенциала глобального потепления равным GWP=3300.

Наиболее близким к заявляемому техническому решению по технической сущности и достигаемому техническому результату является способ, описанный в работе (**Römpp H.**, Seger C, Kaiser C.S., Haslinger E., Schmidt P.C.(2004). Enrichment of hyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) by pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(4), 443-451 (doi:10.1016/j.ejps.2003.10.026)). Данный способ включает экстракцию травы зверобоя продырявленного в специальной установке в течение 1 часа, с помощью сверхкритического диоксида углерода при давлении 120 бар, и температуре 40°C. При этом, достигается выход экстракта 2,4% масс. с содержанием гиперфорина в нем 33%.

К основным недостаткам данного способа относятся: необходимость применения специального оборудования работающего под давлением, которое в сто двадцать раз превышает атмосферное, а также необходимость затраты энергии на операции упаривания экстракта и на операции конденсации паров растворителя в холодильной установке.

Технической задачей изобретения является разработка более эффективного способа выделения гиперфорина и адгиперфорина из травы зверобоя продырявленного, простого в исполнении при котором не требуется специальное и сложное оборудование.

Поставленная задача решается с помощью предлагаемого способа выделения гиперфорина и адгиперфорина из травы зверобоя продырявленного, включающего измельчение сырья, экстрагирование измельченного сырья органическим растворителем, упаривание растворителя, причем, в качестве органического растворителя используют легко кипящую жидкость - метиловый эфир перфторбутана (далее Novac 7100) при соотношении сырье/растворитель 1:(4,5-9,0) масс/масс, экстрагирование сырья осуществляют в течение 1-3 часов в аппарате «Сокслет», полученный экстракт упаривают при температуре 65°C, до получения суммы гиперфорина и адгиперфорина, а экстрагент конденсируют. Сырье, не извлекая из экстрактора, нагревают до 65°C,

продувают воздухом до полного удаления и конденсации экстрагента. Регенерированный экстрагент объединяют с основной массой экстрагента и используют повторно для экстракции новой партии сырья.

5 Диапазон соотношения сырье/растворитель 1:(4,5-9,0) масс/масс, обеспечивает эффективное извлечение гиперфорина и адгиперфорина из растительного сырья и является экономически целесообразным. Нижнее предельное значение 1:4,5 масс/масс, обусловлено тем, что данное количество экстрагента позволяет покрыть насыпной
10 объемом растительного сырья в экстракторе с небольшим избытком экстрагента необходимого для возможности осуществления процесса его циркуляции в экстракционном аппарате. Увеличение соотношения сырье/растворитель более 1:9,0 масс./масс., не приводит к увеличению выхода гиперфорина и адгиперфорина и требует неоправданно высоких энергозатрат и экстрагента.

Заявленный интервал времени экстракции 1-3 часов обеспечивает заданный уровень извлечения гиперфорина и адгиперфорина из сырья. Уменьшение времени экстракции
15 приводит к значительному недоизвлечению гиперфорина и адгиперфорина из травы зверобоя продырявленного. Увеличение времени экстракции является не целесообразным с экономической точки зрения, а также энергозатрат, поскольку не приводит к значительному повышению выхода гиперфорина и адгиперфорина из травы зверобоя продырявленного.

20 Полученный экстракт гиперфорина и адгиперфорина из травы зверобоя продырявленного может быть использован в медицине и ветеринарии.

Количественный анализ гиперфорина и адгиперфорина в экстрактах проводили с помощью обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ
25 ВЭЖХ) с использованием хроматографа фирмы «Agilent Technologies»), серии «Agilent 1200 Infinity)), производства США, при следующих условиях: подвижная фаза (А) - 1% водный раствор муравьиной кислоты, подвижная фаза (В) - этанол в линейном градиентном режиме подачи; хроматографическая колонка - Supelco Ascentis express C18, размеры колонки 100 мм × 4,6 мм, размер частиц 2,7 мкм; скорость подвижной фазы - 0,5 мл/мин; температура хроматографической колонки +35°C; объем образца -
30 1 мкл. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме ESI (ионизация распылением в электрическом поле) с позитивным режимом сканирования в диапазоне масс 200-1000 Да, ММ-APCI, 50 В. Перед количественным анализом точную навеску экстракта растворяли в этаноле 96% об, и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 мин. Этанольный раствор сливали и анализировали.

35 Описание чертежей:

Фиг. 1 - выход гиперфорина в зависимости от времени циркуляции экстрагента.

Фиг. 2 - хроматограмма экстракта полученного с помощью Novac 7100 при аналитической длине волны 275 нм, обозначение: I - гиперфорин; II - адгиперфорин.

40 Фиг. 3 - характеристика гиперфорина в экстракте полученного с помощью Novac 7100.

Фиг. 4 - характеристика адгиперфорина в экстракте полученного с помощью Novac 7100.

Пример 1.

5 Навеску измельченной травы зверобоя продырявленного массой 5,00 г (фракция частиц 0,1-0,5 мм), помещают в циркуляционный экстрактор «Сокслет». Заливают сырье экстрагентом 1:7,5 масс./масс., т.е. 37,5 г (25,0 мл) и начинают процесс экстракции в течение 1 часа. Полученный экстракт упаривают при температуре 65°C, до получения
45 сухого экстракта, а экстрагент конденсируют. Сырье не извлекая из экстрактора,

нагревают до 65°C, продувают воздухом до полного удаления и конденсации экстрагента. Регенерированный экстрагент объединяют с основной массой экстрагента и используют повторно для экстракции новой партии сырья.

Некоторые физико-химические, экологические и токсические показатели сверхкритического диоксида углерода и жидкости Noves 7100 для сравнения приведены в таблице 1.

Таблица 1. Основные физико-химические, экологические и токсические показатели сверхкритического диоксида углерода и жидкости Noves 7100.

Показатель	ск-CO ₂	Noves 7100
Брутто-формула	CO ₂	C ₄ F ₉ OCH ₃
Молекулярная масса, г/моль	44	250
Давление, бар	120	1
Плотность, кг/м ³	716	1510
Температура кипения, °C	40	61
Теплоемкость, Дж/(кг·К)	2961	1183
Теплота испарения, кДж/кг	155	112
Потенциал глобального потепления (GWP)	1	320
Озоноразрушающий потенциал (ODP)	0	0
Горючесть	-	-
Токсичность, ppm	5000	750

Как видно из данных таблицы 1, легкокипящая жидкость Noves 7100 имеет ряд преимуществ при прочих равных условиях по сравнению с аналогичными показателями диоксида углерода в сверхкритическом состоянии, а именно температура кипения Noves 7100 равна 61°C, т.е. при обычных условиях это жидкость, теплоемкость в два раза меньше (1183<2961 Дж/(кг·К)), теплота испарения на 28% меньше по сравнению с ск-CO₂ (112<155 кДж/кг).

Результаты сравнения по основным признакам прототипа и новой технологии приведены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты сравнения по основным признакам прототипа и новой технологии.

Сравнительные признаки	ск-CO ₂	Noves 7100
Циркуляционная экстракция с применением аппарата «Сокслет»	да	да

	Наличие специального оборудования для работы под высоким давлением	необходимо	отсутствует
5	Затраты электроэнергии на конденсацию экстрагента	да	нет
	Рабочее давление, бар	120	1
10	Температура испарителя, °С	40	61-65
	Температура конденсатора, °С	-10	20-30
	Время экстракции, мин	60	60
15	Измельченность ЛРС, мм	0,35-1,0	0,1-0,5
	Выход липофильных веществ по отношению к весу ЛРС, %	2,4	3,8±0,1
20	Выход гиперфорина, %	75-85	87±4

Как видно из данных таблицы 2, результаты сравнения новой технологии перед технологией прототипа демонстрирует ее преимущества, а именно: отсутствие специального оборудования работающего под давлением, рабочее давление составляет 1 атм., температура конденсатора 20-30°С, отсутствие затрат электроэнергии на конденсацию паров экстрагента, при этом за один час циркуляции растворителя достигается выход гиперфорина на уровне 87±4%.

Потери экстрагента составили 1,5±0,2 г (1,0±0,1 мл), что эквивалентно 4% от его первоначального количества.

Пример 2.

Кинетика выхода гиперфорина от времени циркуляции растворителя Noves 7100 приведена на Фиг. 1. Условия такие же, как в примере 1.

Как видно из данных Фиг. 1, выход гиперфорина к первому часу экстракции достигает 87±4%, ко второму часу 95±5%, а к третьему своего предельного значения 99±5%. Поэтому оптимальным временем экстракции можно считать диапазон от 1 до 2 часов экстракции.

Пример 3.

На Фиг. 2 и Фиг. 3 отображена ОФ ВЭЖХ хроматограмма экстракта полученного с помощью Noves 7100 в примере 1.

Как видно из Фиг. 2, в экстракте полученном с помощью растворителя Noves 7100 присутствует два основных вещества (гиперфорин и адгиперфорин), параметры которых представлены на Фиг. 3 и Фиг. 4.

Как видно на Фиг. 3 и Фиг. 4, в экстракте экспериментально доказано присутствие двух доминирующих веществ: гиперфорина (70,3±3,5%) и адгиперфорина (5,1±0,2%), при этом их экспериментально найденные значения максимума поглощения в УФ-спектре и молекулярной массы совпадают с описанными в литературе (Sege С, Römpp Н., Sturm S., Haslinger E., Schmidt P.C., Hadacek F. (2004). Characterization of supercritical fluid extracts of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by HPLC-MS and GC-MS. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 21(4), 453-463 (doi: 10.1016/j.ejps.2003.10.021)).

Техническим результатом является эффективный и экологически чистый способ выделения гиперфорина и адгиперфорина из травы зверобоя продырявленного простой в исполнении при обычных условиях, без специального и сложного оборудования.

5 Таким образом, способ выделения гиперфорина и адгиперфорина из травы зверобоя продырявленного позволяет выделить гиперфорин и адгиперфорин из измельченной травы зверобоя продырявленного с помощью метилового эфира перфторбутана (Novac 7100) при минимальных энергозатратах, обычном давлении, с использованием стандартного оборудования характерного для химико-фармацевтических и/или эфирномасличных предприятий по экологически чистой технологии.

10

(57) Формула изобретения

Способ выделения гиперфорина и адгиперфорина из травы зверобоя продырявленного, включающий измельчение травы зверобоя продырявленного, экстрагирование измельчённого сырья органическим растворителем, упаривание
15 растворителя, отличающийся тем, что в качестве органического растворителя используют легко кипящую жидкость - метиловый эфир перфторбутана при соотношении сырьё/растворитель 1:4,5-9,0 масс./масс., экстрагирование сырья осуществляют методом циркуляции растворителя в течение 1-3 часов, полученный экстракт упаривают при температуре 65 °С до получения готового продукта.

20

25

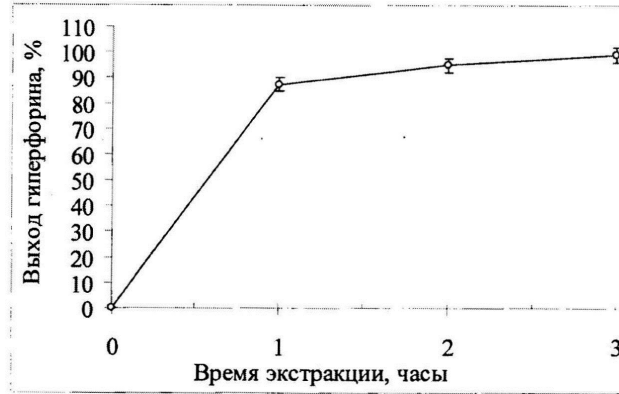
30

35

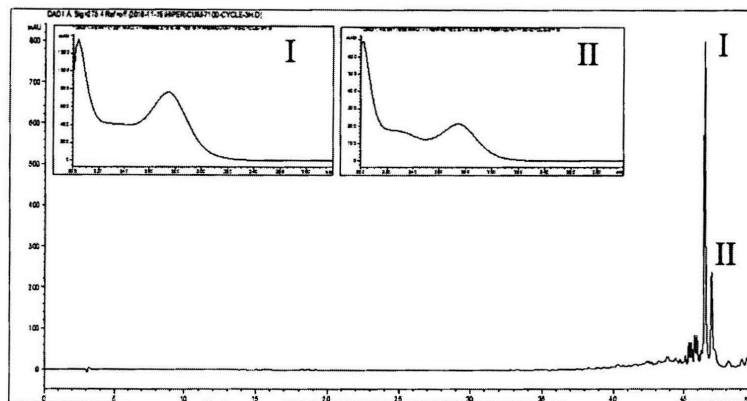
40

45

1

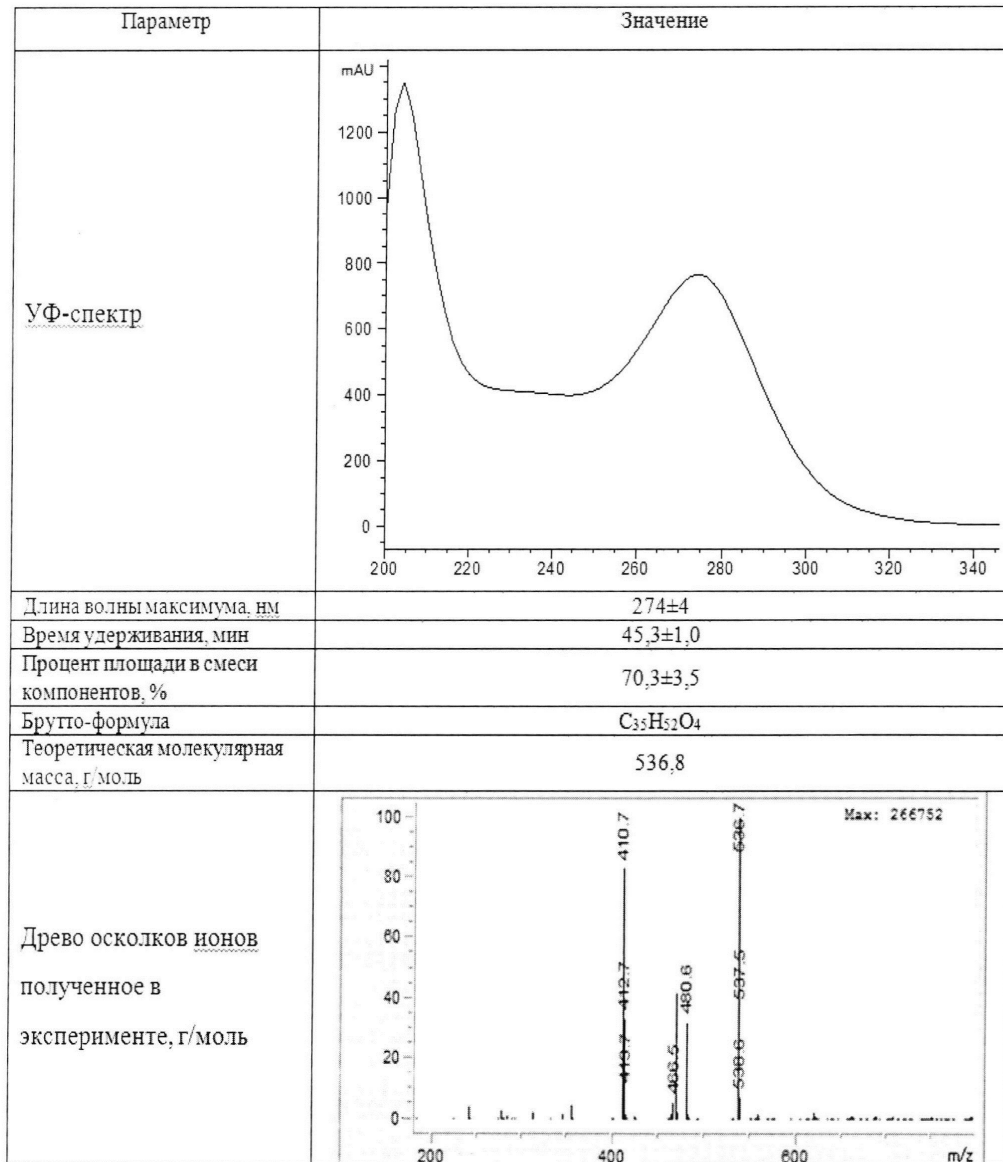


Фиг.1

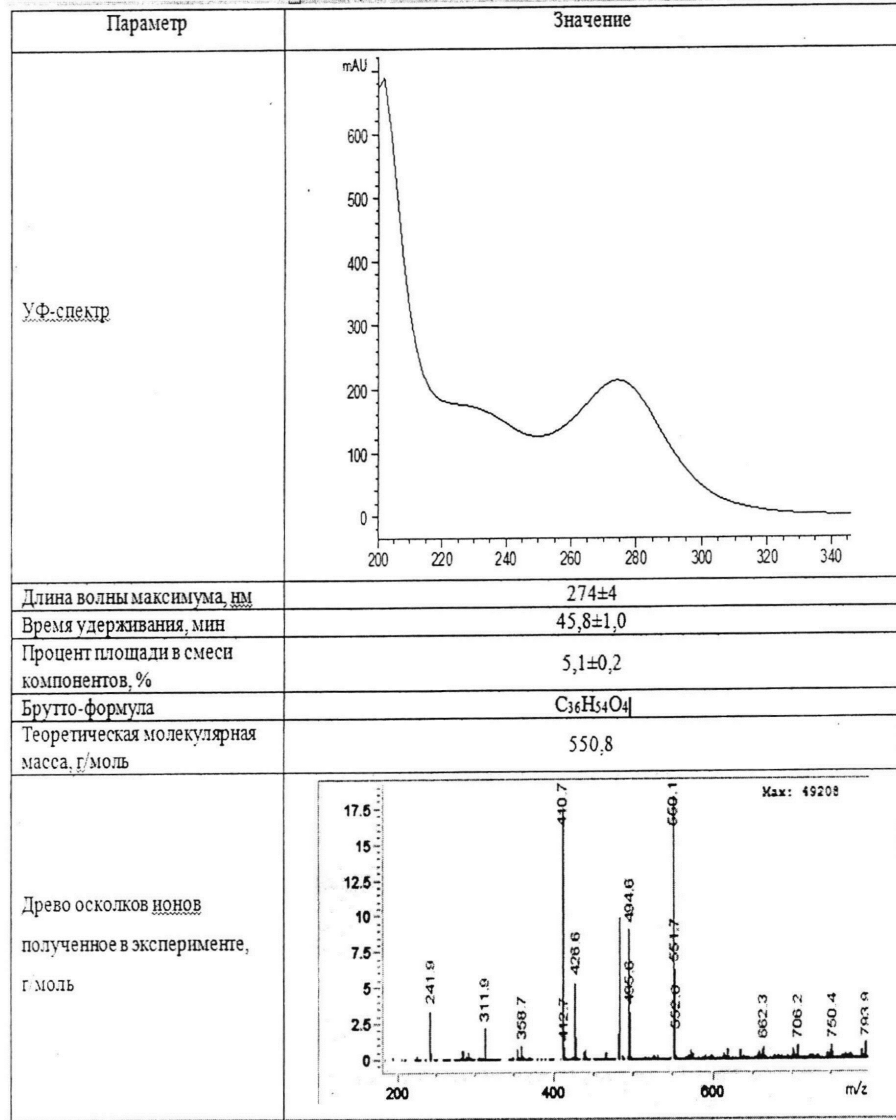


Фиг. 2

2



Фиг. 3



Фиг. 4