

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044232**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.08.03**

**(51)** Int. Cl. **A61K 36/48** (2006.01)  
**A61P 17/18** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**202100265**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2021.06.07**

---

**(54) КОМПЛЕКС БИОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

---

**(43)** **2022.12.30**

**(96)** **2021/015 (AZ) 2021.06.07**

**(71)(72)(73)** Заявитель, изобретатель и патентовладелец:

**ГАРИБЛИ АЙТЕКИН САБУХИ  
КЫЗЫ; СУЛЕЙМАНОВ ТАХИР  
АББАСАЛИ ОГЛУ (AZ)**

**(56)** АЙТАКИН С. ГАРИБЛИ и др. Исследование антибактериальной и антифунгальной активности некоторых экстрактов, полученных из растения *Medicago falcata* L. АЗЕРБАЙДЖАНСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ И ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ-2020-1, Первое полугодие, 2020-06-30, [онлайн], [найдено 2022-02-21], Найдено в <https://www.azpharmjournal.com/ru/jurnal/study-of-antibacterial-and-antifungal-activity-from-the-plant-medicago-falcata>, Реферат RU-C1-2242986

ALDO TAVA et al. Chemical and Biological Activity of Triterpene Saponins from *Medicago* Species. NPC. NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS, 2006, Vol. 1, No 12, pp. 1159-1180, Реферат, с. 1159-1164

JAVID et al. Antimicrobial activity of three medicinal plants (*Artemisia indica*, *Medicago falcata* and *Tecoma stans*). AFR J TRADIT COMPLEMENT ALTERN MED. 2015, Vol. 12, No 3, pp. 91-96, doi.org/10.4314/ajtcam.v12i3.11, весь документ

**(57)** Изобретение относится к области фармации и биотехнологии и касается комплекса биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью, полученных из растительного сырья, в частности из люцерны серповидной (*M. falcata* L.). Сущность заявляемого изобретения состоит в флавоноид-сапониновом комплексе биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью, выделенных из люцерны серповидной (*M. falcata* L.), состав которого содержит: кверцетин, кемпферол, кемпферитрин, кемпферол-7-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид-3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид, апигенин, лютеолин, нарингенин, олеаноловую и урсоловую кислоты. Технический эффект заявляемого изобретения состоит в расширении сырьевой базы лекарственных растений, а именно базы люцерны серповидной (*M. falcata* L.) и выделенной из нее суммы флавоноид-сапонинового комплекса биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью.

**B1**

**044232**

**044232**

**B1**

Изобретение относится к области фармации и биотехнологии и касается комплекса биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью, полученных из растительного сырья, в частности из люцерны серповидной (*M. falcata* L.), широко распространенной во флоре Азербайджана.

Антиоксиданты - вещества, которые могут нейтрализовать окислительное действие свободных радикалов и других веществ. Роль антиоксидантов в нашей жизни невозможно переоценить. Они помогают ограничить агрессию свободных радикалов и возместить нанесенный ими ущерб, противостоят свободным радикалом, прерывая губительный процесс окисления, укрепляют собственную антиоксидантную систему организма, способствуют восстановлению обмена веществ. Растительный мир разнообразен ассортиментом биологически активных веществ, обладающих антиоксидантным действием, которые представляют значительный интерес для дальнейшего поиска новых сырьевых источников.

Известно большое количество природных антиоксидантов: аскорбиновая кислота, токоферол, бета-каротин, ретинол, биогенные аминокислоты, гистамин, полифенолы и фосфолипиды и пр., содержащихся в лекарственных растениях, на основе которых разрабатываются различные лекарственные препараты.

Известна антиоксидантная формула Эвалар (1) для защиты от свободных радикалов, негативного воздействия окружающей среды, преждевременного старения, органы сердечно-сосудистой и репродуктивной систем, глаза и кожа. В состав антиоксидантной формулы входят: аминокислоты (глутатион, ацетилцистеин, таурин, витамины-антиоксиданты (А, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, С, Е), минеральные вещества (цинк, марганец, медь, селен), биофлавоноиды - растительные антиоксиданты (экстракты гинкго билоба, расторопши, клюквы, листьев красного винограда, зеленого чая, шиповника, перца черного, дигидрокверцетин), каротиноиды-антиоксиданты (лютеин, зеаксантин).

В последние годы достигнуты большие успехи в области химии и фармакологии природных флавоноидов и тритерпеновых сапонинов, широко распространенных в растительном мире. Особый интерес представляют известные ценные сельскохозяйственные культуры, а именно представители семейства Бобовых, характеризующихся широким набором биологически активных веществ (БАВ), в частности представитель рода люцерны (*Medicago* L.) - люцерна посевная (*M. sativa* L.), которая издавна используется в народной медицине. Однако другой представитель этого рода - люцерна серповидная (*M. falcata* L.) мало изучена и представляет значительный интерес как сырьевой источник биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью.

Задача изобретения состоит в поиске нового сырьевого источника, расширяющего арсенал сырьевой растительной лекарственной базы для производства биологически активных веществ, в виде комплекса биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью. Сущность заявляемого изобретения состоит в комплексе флавоноид-сапониновых биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью, выделенных из люцерны серповидной (*M. falcata* L.), в состав которого входят: кверцетин, кемпферол, кемпферитрин, кемпферол-7-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид-3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид, апигенин, лютеолин, нарингенин, олеаноловую и урсоловую кислоты.

Поиск и анализ источников в данной области показал, что люцерна серповидная (*M. falcata* L.), как лекарственное сырье, мало изучена, найден один источник (2), в котором трава *M. falcata* L. входит в состав лекарственного сбора.

Новизна заявляемого изобретения состоит в использовании нового растительного сырья, а именно люцерны серповидной, для получения биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью и их выделения и идентификации. Следовательно, заявляемое решение соответствует критериям патентоспособности изобретения и может быть признано изобретением.

Компоненты, входящие в сумму комплекса, являются известными в медицине как антиоксиданты и лекарственные средства:

Кверцетин - флавоноид, неуглеводный биологически активный компонент и относится к витаминным препаратам группы Р. Кверцетин обладает противовоспалительным и антиоксидантными эффектами, снижает синтез лейкотриенов, серотонина и других медиаторов воспаления.

Кемпферол - флавоноид обладает противовоспалительными, антимикробными, кардиопротекторными, обезболивающими свойствами, снижает синтез жирных кислот в злокачественных клетках, и это уменьшает развитие некоторых видов рака, снижает "окислительный стресс" в организме, усиливая защитные функции и ускоряя обмен веществ, мешает накапливаться в организме липофусцину - пигменту старения.

Кемпферитрин и кемпферол-7-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид-3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид - гликозиды кемпферола. Они обладают широким спектром фармакологической активности, в том числе антиоксидантной, противовоспалительной, антимикробной, противоопухолевой, кардиопротекторной, нейропротекторной, антидиабетической, антиостеопорозной, эстрогенной/антиэстрогенной, анксиолитической, обезболивающей и противоаллергической активностью.

Апигенин - флавоноид, широко распространенный в растительном мире. Он действует как поглотитель свободных радикалов и антиоксидант, уменьшающий окислительный стресс.

Лютеолин - флавоноид, обладает противовоспалительным действием.

Нарингенин - флавоноид, обладает мощными антиоксидантным, противоаллергическим и противовоспалительными свойствами.

Олеаноловая кислота - соединение относится к пентациклическим тритерпенам, проявляет слабую анти-ВИЧ и слабую анти-HCV активность *in vitro*, может замедлить прогрессирование аденолейкодистрофии (АЛД).

Урсоловая кислота - соединение относится к пентациклическим тритерпенам, которым свойственна высокая биологическая активность. Она нашла широкое применение в косметологии, диетологии и бодибилдинге.

Комплекс биоактивных веществ, обладающих антиоксидантной активностью, получают следующим образом.

Высушенную и измельченную надземную часть растительного сырья *M. falcata* L. (0,6 кг) экстрагируют при комнатной температуре 3 раза по 6,0 л 80%-ным этанолом. Объединенный экстракт выпаривают под вакуумом до сухого остатка (52,9 г), затем разделяют на фракции, последовательно экстрагируя полученный сухой остаток петролейным эфиром для удаления липофильных веществ и с получением сухого остатка; дихлорметаном с целью удаления хлорофилла; и этилацетатом с выделением комплекса флавоноидов и сапонинов, который высушивают и экстрагируют *n*-бутанолом с целью удаления флавоноидных моно-, ди- и тригликозидов. Полученный продукт, в количестве 2,48 г, содержащий комплекс биоактивных веществ, обладающих антиоксидантной активностью, представляет собой порошок желтоватого цвета без запаха и вкуса. Выход на сырье 1,8%. Хорошо растворяется в метаноле и этаноле.

Качественный и количественный состав полученного комплекса, изучали следующим образом.

Этилацетатное извлечение (0,9192 г) фракционировали на Флэш-хроматографе Combi Flash Rf flash, в качестве колонки выбран C18 RediSep Rf 130 г (CV 133 мл - 85 мл/мин.). Фракционирование проведено под давлением 225 psi (15,5 бар) и длиной волны 254 нм. Скорость потока 40 мл/мин с градиентом MeOH и H<sub>2</sub>O. Были получены фракции X, A, B, C, и D. Полученные фракции проверены в системе этилацетат - муравьиная кислота - ледяная уксусная кислота - вода (100:11:11:26) методом тонкослойной хроматографии и путем распыления куминового альдегида, и было установлено содержание в них сапонинофлавоноидных соединений.

фракции X	0.0050 г
фракции A	0.0078 г
фракции B	0.3473 г
фракции C	0.4153 г
фракции D	0.009 г

Полученные фракции растворяли в метаноле и анализировали методом тонкослойной хроматографии. В качестве системы использовали этилацетат-муравьиную кислоту-ледяную уксусную кислоту-воду (100:11:11:26), а в качестве проявителя - куминовый альдегид. На основе полученного анализа, для дальнейшего исследования были взяты фракции B и C. Фракцию B (0,34 г) вновь обрабатывали флэш-хроматографией. В результате флэш-хроматографирования фракции B, полученной из этилацетатной фракции, получено 10 новых фракций (B-1 - B-10). Для фракционирования в флэш-хроматографии выбрана колонка C18 Redi Sep Rf 30 г (CV 26,4 мл -35 мл/мин). Анализ проводится под давлением 350 psi (24 бар), длина волны 254 нм, скорость потока 15 мл/мин, градиент MeOH и H<sub>2</sub>O.

фракции B-1	0.0008 г
фракции B-2	0.0001 г
фракции B-3	0.0002 г
фракции B-4	0.0012 г
фракции B-5	0.0071 г
фракции B-6	0.022 г
фракции B-7	0.2026 г
фракции B-8	0.0315 г
фракции B-9	0.009 г
фракции B-10	0.0363 г

Полученные фракции обрабатываются методом тонкослойной хроматографии. В качестве системы использовали этилацетат-муравьиную кислоту-ледяную уксусную кислоту-воду (100:11:11:26), в качестве проявителя - куминовый альдегид. По полученным результатам Фракция B-10, Фракция B-8, Фракция B-7 и Фракция B-6 взяты для дальнейших исследований.

Из фракции B-10 (20 мг), полученной при хроматографировании в колонке с сефадексом (элюент: чистый метанол), получено 3 фракции (B-10-1 - B-10-3). Из которых фракции B-10-2 и B-10-3 идентифицированы как Кемпферол и Кверцетин.

Из фракции B-8 (31,5 мг), полученной при хроматографировании в колонке с сефадексом (элюент: чистый метанол), получено 4 фракции (B-8-1 - B-8-4). Из которых фракция B-8-3 идентифицирована как Кемпферол-7-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид-3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид.

В результате хроматографирования в колонке с полиамидом фракции B-7 получено 8 новых фракций (B-7-1 - B-7-8). Из фракции B-7-4 при хроматографировании в колонке с полиамидом (элюент: чистый метанол и вода) получено 6 фракций (B-7-4-1 - B-7-4-6). Из которых фракция B-7-4-3 идентифицирована как Нарингенин.

Из фракции В-6 (22 мг) в результате хроматографирования в колонке с сефадексом (элюент: чистый метанол) получено 4 фракции (В-6-1 - В-6-4). Из которых фракция В-6-2 идентифицирована как Кемпферитрин.

В результате флеш-хроматографирования фракции С (85,2 мг), полученной из этилацетатной фракции, получено 5 новых фракций (С-1 - С-5).

В результате флеш-хроматографирования фракции С-2 получено 6 новых фракций (С-2-1 - С-2-6).

Из фракции С-2-3 при хроматографировании в колонке с сефадексом (элюент: чистый метанол) получено 4 фракции (С-2-3-1 - С-2-3-4). Из которых фракция С-2-3-3 идентифицирована как Апигенин.

Из фракции С-2-5 при хроматографировании в колонке с сефадексом (элюент: чистый метанол) получено 6 фракций (С-2-5-1 - С-2-5-6). Из которых фракция С-2-5-4 идентифицирована как Лютеолин.

В результате флеш-хроматографирования фракции С-3 получено 7 новых фракций (С-3-1 - С-3-7).

Из фракции С-3-5 при хроматографировании в колонке с сефадексом (элюент: чистый метанол) получено 5 фракций (С-3-5-1 - С-3-5-5). Из которых фракции С-3-5-3 и С-3-5-5 идентифицированы соответственно Урсоловая и Олеаноловая кислоты.

В результате хроматографических и спектроскопических исследований установлено, что флавоноид-сапониновая сумма состоит из следующих веществ: кверцетина, кемпферола, кемпферитрина, кемпферол-7-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид-3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид, апигенина, лютеолина, нарингенина, олеаноловой и урсоловой кислот.

Антиоксидантная активность флавоноид-сапониновой фракции, полученной из вида *M. falcata* L., изучалась тремя методами: 2,2-дифенил-1-пикрил-гидразил-гидратом (D.P.P.H.), 2,2-азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислотой (А.В.Т.С.) и методом антиоксидантной силы восстановления железа (F.R.A.P.). В качестве стандартных образцов использовали галловую кислоту, аскорбиновую кислоту, кверцетин, кофейную кислоту, тролокс и кемпферол. Стандарты и сумма флавоноидов-сапонинов для анализов D.P.P.H., А.В.Т.С. и F.R.A.P. использовались в 6 различных концентрациях.

Для D.P.P.H. анализа использовали растворы веществ в следующих концентрациях: галловая кислота, кофейная кислота, кемпферол и кверцетин соответственно 0.5  $\mu$ г/мл, 1  $\mu$ г/мл, 1.25  $\mu$ г/мл, 2  $\mu$ г/мл, 2.5  $\mu$ г/мл, 5  $\mu$ г/мл, аскорбиновая кислота 3  $\mu$ г/мл, 5  $\mu$ г/мл, 6  $\mu$ г/мл, 7.5  $\mu$ г/мл, 10  $\mu$ г/мл, 15  $\mu$ г/мл, тролокс 2.5  $\mu$ г/мл, 3  $\mu$ г/мл, 5  $\mu$ г/мл, 7.5  $\mu$ г/мл, 10  $\mu$ г/мл, 15  $\mu$ г/мл, флавоноид-сапониновая фракция 5  $\mu$ г/мл, 10  $\mu$ г/мл, 20  $\mu$ г/мл, 25  $\mu$ г/мл, 50  $\mu$ г/мл, 100  $\mu$ г/мл.

Для А.В.Т.С. анализа использовали растворы веществ в следующих концентрациях: кофейная кислота 1  $\mu$ г/мл, 2  $\mu$ г/мл, 2.5  $\mu$ г/мл, 5  $\mu$ г/мл, 10  $\mu$ г/мл, 12.5  $\mu$ г/мл, галловая кислота 0.25  $\mu$ г/мл, 0.5  $\mu$ г/мл, 1  $\mu$ г/мл, 2  $\mu$ г/мл, 2.5  $\mu$ г/мл, 5  $\mu$ г/мл, кверцетин 0.5  $\mu$ г/мл, 1  $\mu$ г/мл, 2  $\mu$ г/мл, 2.5  $\mu$ г/мл, 5  $\mu$ г/мл, 10  $\mu$ г/мл, аскорбиновая кислота, тролокс и кемпферол 2.5  $\mu$ г/мл, 5  $\mu$ г/мл, 6.25  $\mu$ г/мл, 10  $\mu$ г/мл, 12.5  $\mu$ г/мл, 25  $\mu$ г/мл, флавоноид-сапониновая фракция 2.5  $\mu$ г/мл, 5  $\mu$ г/мл, 10  $\mu$ г/мл, 20  $\mu$ г/мл, 25  $\mu$ г/мл, 50  $\mu$ г/мл.

Для F.R.A.P. анализа использовали растворы веществ в следующих концентрациях: галловая кислота и кверцетин 0.25  $\mu$ г/мл, 0.5  $\mu$ г/мл, 1  $\mu$ г/мл, 1.25  $\mu$ г/мл, 2  $\mu$ г/мл, 2.5  $\mu$ г/мл, кофейная кислота и аскорбиновая кислота 0.5  $\mu$ г/мл, 1  $\mu$ г/мл, 1.25  $\mu$ г/мл, 2  $\mu$ г/мл, 2.5  $\mu$ г/мл, 5  $\mu$ г/мл, тролокс 1  $\mu$ г/мл, 2  $\mu$ г/мл, 2.5  $\mu$ г/мл, 5  $\mu$ г/мл, 8  $\mu$ г/мл, 10  $\mu$ г/мл, кемпферол 2.5  $\mu$ г/мл, 4  $\mu$ г/мл, 5  $\mu$ г/мл, 8  $\mu$ г/мл, 10  $\mu$ г/мл, 20  $\mu$ г/мл, флавоноид-сапониновая фракция 2.5  $\mu$ г/мл, 4  $\mu$ г/мл, 5  $\mu$ г/мл, 8  $\mu$ г/мл, 10  $\mu$ г/мл, 20  $\mu$ г/мл.

Выделенная флавоноид-сапониновая фракция при анализе методами А.В.Т.С. и D.P.P.H. показала высокую активность.

Технический эффект заявляемого изобретения состоит в расширении сырьевой базы лекарственных растений, а именно базы люцерны серповидной (*M. falcata* L.) и выделенной из нее суммы флавоноид-сапонинового комплекса биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью.

#### Литература

1. "shop.evalar.ru" Антиоксидантная формула
2. Патент РФ №2197256. Лекарственное растительное средство "секрет молодости" для омоложения человеческого организма.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Применение комплекса биологически активных флавоноид-сапониновых веществ, выделенных из люцерны серповидной (*M. falcata* L.), в состав которого входят: кверцетин, кемпферол, кемпферитрин, кемпферол-7-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид-3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид, апигенин, лютеолин, нарингенин, олеаноловая и урсоловая кислоты в качестве комплекса, обладающего антиоксидантной активностью.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2