



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A61K 36/756 (2022.08); B01D 11/02 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022122629, 23.08.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
23.08.2022

Дата регистрации:  
28.12.2022

Приоритет(ы):  
(22) Дата подачи заявки: 23.08.2022

(45) Опубликовано: 28.12.2022 Бюл. № 1

Адрес для переписки:  
117216, Москва, ул.Грина, 7, Руководителю  
ФГБНУ ВИЛАР

(72) Автор(ы):  
Шейченко Ольга Петровна (RU),  
Радимич Андрей Иванович (RU),  
Уютова Елена Викторовна (RU),  
Звездина Екатерина Владимировна (RU),  
Сайбель Ольга Леонидовна (RU),  
Шейченко Владимир Иванович (RU),  
Адамов Григорий Васильевич (RU),  
Лукашина Татьяна Викторовна (RU),  
Федотчева Татьяна Александровна (RU),  
Фадеев Николай Борисович (RU),  
Мизина Прасковья Георгиевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):  
Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение Всероссийский  
научно-исследовательский институт  
лекарственных и ароматических растений  
(ФГБНУ ВИЛАР) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: CW XIAO et al. Antifungal Efficacy  
of Phellodendron amurense Ethanol Extract  
against Trichophyton mentagrophytes in Rabbits  
// Pak Vet J, 34(2): 219-223. НАУМОВА О.А.  
Фармакогностическое исследование плодов  
бархата амурского с целью контроля качества  
и стандартизации сырья // Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата (см. прод.)

(54) Способ получения лекарственной субстанции из листьев бархата амурского

(57) Реферат:

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, в частности к способу получения лекарственной субстанции, получаемой из листьев бархата амурского (*Phellodendron amurense* Rupr) и листьев бархата амурского Лавалея (*Phellodendron amurense* var. *Lavallei* (Dode) Spague) семейства Рутовых (*Rutaceae*) и применяемой в качестве противовирусного и антигепатотоксического

лекарственного средства Флакозид. Техническим результатом предлагаемого изобретения является разработка усовершенствованного способа получения субстанции флакозида из листьев бархата амурского, обладающей противовирусной активностью в отношении простого вируса герпеса и гепатита С, благодаря высокому содержанию основного действующего вещества фелламурина не менее 96% (метод

ВЭЖХ). Технический результат достигается при использовании способа получения лекарственной субстанции из листьев бархата амурского (*Phellodendron amurense* Rupr) и листьев бархата амурского Лавалея (*Phellodendron amurense* var.*Lavallei* (Dode) Spague) семейства Рутовых (*Rutaceae*), включающего трехкратную экстракцию высушенного и измельченного сырья водным этиловым спиртом при соотношении сырье : экстрагент, равном 1:10, в концентрации 40-60% при температуре 20-60°C в течение двух часов, подачу на каждую последующую экстракцию свежего экстрагента в количестве, равном слитому извлечению, упаривание полученных экстрактов последовательно по мере поступления до объема 1/20, объединение водных кубовых концентратов и их обработку четыре

раза смесью 1,2-дихлорэтаном с этиловым спиртом в соотношении 1:1:1, упаривание остатков органического растворителя, подщелачивание водных кубовых остатков 10-12% водным раствором гидрата окиси натрия до pH 7-7,68, четырехкратную обработку водных щелочных растворов этилацетатом в соотношении 1:0,5, объединение этилацетатных экстрактов, промывку водой, сушку над сернокислым натрием и упаривание, получение технического продукта флакозида кристаллизацией из смеси этилацетат : вода охлаждением, с последующей фильтрацией и промывкой охлажденным этилацетатом, сушку технического продукта, перекристаллизацию из водного этилового спирта и получение готового флакозида. 1 табл.

(56) (продолжение):

фармацевтических наук, 2014;БОРТНИКОВА В.В. и др.Ретроспективный анализ клинического изучения лекарственного препарата "Флакозид" в терапии заболеваний гепатобилиарной системы. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(3):100-104.

RU 2787103 C1

RU 2787103 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 36/756* (2006.01)  
*B01D 11/02* (2006.01)  
*A61K 127/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 36/756 (2022.08); B01D 11/02 (2022.08)*(21)(22) Application: **2022122629, 23.08.2022**(24) Effective date for property rights:  
**23.08.2022**Registration date:  
**28.12.2022**

Priority:

(22) Date of filing: **23.08.2022**(45) Date of publication: **28.12.2022** Bull. № 1

Mail address:

**117216, Moskva, ul.Grina, 7, Rukovoditelyu  
FGBNU VILAR**

(72) Inventor(s):

**Shejchenko Olga Petrovna (RU),  
Radimich Andrej Ivanovich (RU),  
Uyutova Elena Viktorovna (RU),  
Zvezdina Ekaterina Vladimirovna (RU),  
Sajbel Olga Leonidovna (RU),  
Shejchenko Vladimir Ivanovich (RU),  
Adamov Grigorij Vasilevich (RU),  
Lukashina Tatyana Viktorovna (RU),  
Fedotcheva Tatyana Aleksandrovna (RU),  
Fadeev Nikolaj Borisovich (RU),  
Mizina Praskovya Georgievna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe  
nauchnoe uchrezhdenie Vserossijskij  
nauchno-issledovatel'skij institut lekarstvennykh  
i aromatischeskikh rastenij (FGBNU VILAR)  
(RU)**

(54) **METHOD FOR OBTAINING A MEDICINAL SUBSTANCE FROM AMUR VELVET LEAVES**

(57) Abstract:

FIELD: chemical and pharmaceutical industry.

SUBSTANCE: invention relates to the chemical and pharmaceutical industry, in particular to a method for producing a medicinal substance obtained from Amur velvet leaves (*Phellodendron amurense* Rupr) and Amur Laval velvet leaves (*Phellodendron amurense* var. *Lavallei* (Dode) Spague) of the Rutaceae family and used in as an antiviral and antihepatotoxic drug Flacoside. The effect is achieved using a method for obtaining a medicinal substance from Amur velvet leaves (*Phellodendron amurense* Rupr) and Amur Laval velvet leaves (*Phellodendron amurense* var. *Lavallei* (Dode) Spague) of the Rutaceae family, including three-fold extraction of dried and crushed raw materials with aqueous ethyl alcohol at a ratio of raw material: extractant equal to 1:10, at a concentration of 40-60% at a temperature of 20-60°C for two hours, supply of fresh extractant for each subsequent extraction in an amount equal to the drained extraction, evaporation of

the obtained extracts sequentially as they arrive up to a volume of 1/20, combining aqueous distillation concentrates and processing them four times with a mixture of 1,2-dichloroethane with ethyl alcohol in a ratio of 1:1:1, evaporation of organic solvent residues, alkalization of aqueous distillation residues with a 10-12% aqueous solution of sodium hydroxide up to pH 7-7.68, four-fold treatment of aqueous alkaline solutions of ethyl cetate in a ratio of 1:0.5, combining ethyl acetate extracts, washing with water, drying over sodium sulfate and evaporation, obtaining the technical product flacoside by crystallization from a mixture of ethyl acetate: water by cooling, followed by filtration and washing with chilled ethyl acetate, drying the technical product, recrystallization from aqueous ethyl alcohol and obtaining the finished flacoside.

EFFECT: development of an improved method for obtaining a flacoside substance from Amur velvet leaves, which has antiviral activity against herpes

simplex virus and hepatitis C, due to the high content of the main active ingredient fellamurin of at least 96%

(HPLC method).  
1 cl, 1 tbl

R U 2 7 8 7 1 0 3 C 1

R U 2 7 8 7 1 0 3 C 1

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, в частности к способу получения лекарственной субстанции, получаемой из листьев бархата амурского (*Phellodendron amurense* Rupr) и листьев бархата амурского Лавалля (*Phellodendron amurense* var. *Lavallei* (Dode) Spague) семейства Рутовых (*Rutaceae*) и применяемой в качестве противовирусного и антигепатотоксического лекарственного средства «Флакозид».

Флакозид разрешен для медицинского применения у взрослых и детей как противовирусное средство при острых вирусных гепатитах А и Б, первичных и рецидивирующих формах простого герпеса экстрагенитальной и генитальной локализации, опоясывающем лишае, ветряной оспе и кори [1-2]. Основным действующим веществом «Флакозида» является флавоноидный глюкозид фелламурин - флаванол (синоним - феллавин, 8-пренилдигидрокемпферол-7-глюкозид).

Особый интерес среди реликтовых растений Дальнего Востока представляет бархат амурский (*Phellodendron Amurense*). Во всех частях бархата амурского содержатся биологически активные вещества: алкалоиды берберин и пальматин, кумарины, сапонины, флавоноиды, фелламурин и амурензин, феллозид, дигидрофеллозид, гликозиды, эфирное масло, норикаризид, феллодендрин, магнофлорин, обакунон, обакулактон, фитонциды, водорастворимые витамины. Благодаря содержанию этих биологически активных веществ, плоды бархата амурского способны оказывать желчегонное, антигепатотоксическое, а также гепатопротекторное действие [3].

Известно использование флакозида в различных комплексах на основе природных соединений растительного происхождения, обладающих противомикробным действием в отношении инфекций, передаваемым половым путем [6-9]. Кроме того, флакозид является одним из компонентов для лечения и профилактики заболевания печени, выбранного из группы, включающей гепатиты типов А, Б, С, и Е и алкогольный гепатит [10-12]. Фелламурин проявляет противоопухолевую активность на клетках остеосаркомы [13].

Препарат оказывает выраженное иммуностимулирующее действие на гуморальное звено системы иммунитета [14].

В качестве прототипа выбран способ получения аналога флакозида феллавина путем экстракции листьев бархата амурского спиртом, заключающийся в экстракции растительного сырья 45-55% водным спиртом, в упаривании водно-спиртового извлечения до водного остатка, в последующей экстракции от неполярных соединений хлороформом, в извлечении суммы флавоноидов из водного остатка этилацетатом, в упаривании этилацетатных извлечений, в последующей кристаллизации целевого продукта из смеси этилацетат : вода при соотношении 1:1, с выходом целевого продукта 3% от сухого веса сырья. Недостатком прототипа является длительность экстракции путем настаивания сырья до 30 часов, использование токсического растворителя метанола. Экстракция хлороформом полностью не очищает водный кубовый остаток от смол, которые мешают кристаллизации и влияют на качество продукции [15].

Недостатком прототипа является длительность экстракции путем настаивания сырья до 30 часов, использование токсического растворителя метанола. Экстракция хлороформом полностью не очищает водный кубовый остаток от смол, которые мешают кристаллизации и влияют на качество продукции.

Задачей предлагаемого изобретения является усовершенствование способа получения лекарственной субстанции на основе листьев бархата амурского с содержанием фелламурина в сырье не ниже 1,0% повышение качества и выхода целевого продукта (до 70% от содержания в сырье, с содержанием фелламурина в готовом продукте не

ниже 96%) для обеспечения заявленной биологической активности.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является разработка усовершенствованного способа получения лекарственной субстанции из листьев бархата амурского, обладающей противовирусной активностью в отношении простого вируса герпеса и гепатита С, благодаря высокому содержанию основного действующего вещества фелламурина не менее 96% (метод ВЭЖХ). Усовершенствование технологии позволяет получить выход флакозида выше, чем в прототипе.

Технический результат достигается при использовании разработанного способа получения лекарственной субстанции на основе листьев бархата амурского (*Phellodendron amurense* Rupr) и листьев бархата амурского Лавалея (*Phellodendron amurense* var. *Lavallei* (Dode) Spague) семейства Рутовых (Rutaceae), включающий трехкратную экстракцию высушенного и измельченного сырья водным этиловым спиртом при соотношении сырье : экстрагент равном 1:10 в концентрации 40-60% при температуре 20-60 °С в течение двух часов, подачу на каждую последующую экстракцию свежего экстрагента в количестве равном слитому извлечению, упаривание полученных экстрактов последовательно по мере поступления до объема 1/20, объединение водных кубовых концентратов и их обработку четыре раза смесью 1,2-дихлорэтаном с этиловым спиртом в соотношении 1:1:1, упаривание остатков органического растворителя, подщелачивание водных кубовых остатков 10-12% водным раствором гидрата окиси натрия до pH 7-7,68, четырехкратную обработку водных щелочных растворов этилацетатом в соотношении 1:0,5, объединение этилацетатных экстрактов, промывку водой, сушку над серноокислым натрием и упаривание, получение технического продукта флакозида кристаллизацией из смеси водного раствора 1,2-этилацетат охлаждением, с последующей фильтрацией и промывкой охлажденным 1,2-этилацетатом, сушку технического продукта, перекристаллизацию из водного этилового спирта и получение готового флакозида.

Предложенное техническое решение иллюстрируется следующими примерами 1 и 2 получения лекарственного средства «Флакозид».

#### Пример 1.

Исходным сырьем являются листья бархата амурского, заготовленные в июле месяце (согласно фармакопейной статье). Высушенное измельченное сырье, проходящее сквозь сито 0,5-5 мм, с влажностью сырья  $W=9,5\%$  в количестве 0,201 кг и содержанием фелламурина в сырье 3,7% помещают в плоскодонную колбу вместимостью 3,0 л.

Экстракцию проводят 40% водным спиртом этиловым в соотношении сырье-экстрагент (1:10) при комнатной температуре или при нагревании (45°C) в течение 2-х часов при постоянном перемешивании. Экстракцию проводят трехкратно. На каждую последующую экстракцию подают свежий экстрагент, равный объему слитого извлечения.

Водно-спиртовые извлечения фильтруют на воронке Бюхнера в колбу Бунзена в вакууме. В качестве фильтрующего материала используют серо-шинельное сукно. Получают от первой экстракции 1,7 л водно-спиртового извлечения, от второй экстракции 1,8 л водно-спиртового извлечения, от третьей экстракции получают 1,5 л водно-спиртового извлечения.

Полученные водно-спиртовые извлечения упаривают до 1/20 от первоначального объема, последовательно по мере поступления. Водно-кубовые концентраты объединяют и получают водно-кубовый остаток в количестве 0,250 л с плотностью  $\rho=1,05$  г/см<sup>3</sup>. К водному кубовому остатку в количестве 0,250 л приливают 0,250 л спирта этилового 96,4% и 0,250 дихлорэтана, реакционную смесь помещают в делительную воронку

емкостью 2,0 л, затем перемешивают и отделяют нижний слой в количестве 0,250 л (1,2-дихлорэтановый экстракт). Обработку дихлорэтаном проводят 4 раза по 0,250 л. Получают 1,2-дихлорэтановый экстракт в количестве 1,0 л, который два раза промывают дистиллированной водой по 100 мл.

5 Промывную воду от дихлорэтана присоединяют к очищенному водному кубовому остатку и упаривают в вакууме до 0,450 л водного кубового остатка. 1,2-дихлорэтановый экстракт выводят из технологического процесса. Очищенный водный кубовый остаток подщелачивают 10-12% водным раствором гидрата окиси натрия до pH 7-7,68. Щелочной раствор обрабатывают этилацетатом, насыщенным водой в соотношении  
10 как (1:0,5) четыре раза. Полученные этилацетатные экстракты объединяют и промывают один раз 100 мл дистиллированной водой, затем экстракт высушивают над сернокислым натрием и упаривают в вакууме.

Получают 10,27 г суммы фенольных соединений, которую растворяют в 70 мл этилацетата на водяной бане при температуре 65°C, затем раствор переносят в  
15 коническую колбу емкостью 300 мл туда же добавляют 70 мл горячей воды дистиллированной (65-70°C) и несколько кристалликов фелламурина. По мере остывания раствора начинается кристаллизация, затем раствор ставят в холодильник. Образовавшийся кристаллический осадок фильтруют в вакууме переносят в химический стакан, к осадку приливают холодный этилацетат (50 мл), перемешивают и фильтруют  
20 в вакууме, а затем сушат и получают технического флакозида 6,16 г.

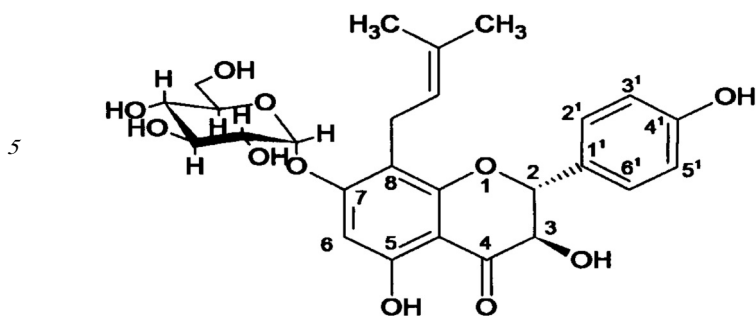
Затем проводят перекристаллизацию технического продукта. 6,16 г флакозида помещают в круглодонную колбу и приливают в 40 мл 96,3% спирта этилового и растворяют на водяной бане при температуре 70°C, туда же в колбу добавляют 40 мл  
25 горячей (70°C) воды дистиллированной и вращают колбу на водяной бане до полного растворения, затем реакционную смесь фильтруют через складчатый бумажный фильтр самотеком в плоскодонную колбу емкостью 200 мл, круглодонную колбу ополаскивают 20 мл горячего 50% водного этанола и присоединяют к фильтрату, добавляют несколько кристалликов фелламурина, охлаждают при комнатной  
30 температуре, помещают в холодильник и через 3-4 часа получают кристаллический продукт, который отфильтровывают в вакууме, переносят в химический стакан, к осадку приливают охлажденный 50% водный спирт этиловый в количестве 70 мл, тщательно перемешивают и фильтруют в вакууме.

Полученный влажный готовый продукт сушат в вакуум-сушильном шкафу при температуре 70°C в течение 4 часов. Получают 4,94 г готового продукта «флакозида»  
35 с содержанием основного вещества 96,72%. Выход готового продукта от начала процесса 70,5%.

Идентификацию полученной субстанции "Флакозид" проводили методом ЯМР.

В <sup>1</sup>H ЯМР-спектре раствора флакозида в ДМСО присутствуют следующие сигналы:  
40 два трехпротонных сигнала при 1,49 и 1,56 м.д. (по три протонные единицы каждый), относятся к изопренильному остатку при C-8, синглет при 6,29 м.д. при C-6, два дублета при 6,78 м.д. и 7,31 м.д. (по две протонные единицы каждый) (протоны 3', 5', и 2', 6' соответственно) относятся к ароматическим протонам кольца В, Фенольные гидроксильные группы при C-4' и C-5 (сигналы в виде синглетов) 9,54 м.д. и 11,81 м.д.  
45 соответственно. Сигнал при C-5 со значением 11,81 м.д. относится к фенольной гидроксильной группе, значение которой относится к флаванонолам.

Фелламурин - (2R,3R)-3,5-дигидрокси-2-(4-гидроксифенил)-8-(3-метилбут-2-енил)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-2-ил]окси-2,3-дигидрохромен-4-он. Молярная масса 518,515 г/моль. Брутто формула C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>O<sub>11</sub>



Количественное определение фелламурина в готовом продукте проводили методом ВЭЖХ, в качестве внутреннего стандарта использовали рабочий стандартный образец фелламурина.

Полученная субстанция флакозид представляет собой мелкокристаллический порошок от белого цвета или белого с бежеватым оттенком, содержащий в качестве доминирующего компонента фелламурин. «Флакозид» используют для приготовления таблеток.

#### Пример 2.

Исходным сырьем являются листья бархата амурского, заготовленные в июле месяце (согласно фармакопейной статье). Высушенное измельченное сырье, проходящее сквозь сито 0,5-5 мм, с влажностью сырья  $W=9,5\%$  в количестве 0,607 кг и содержанием фелламурина в сырье 3,7% помещают в плоскодонную колбу вместимостью 10,0 л.

Экстракцию проводят 50% водным спиртом этиловым в соотношении сырье-экстрагент (1:10) при комнатной температуре или при нагревании ( $45^{\circ}\text{C}$ ) в течение 2-х часов при постоянном перемешивании. Экстракцию проводят трехкратно. На каждую последующую экстракцию подают свежий экстрагент, равный объему слитого извлечения. Водно-спиртовые извлечения фильтруют на воронке Бюхнера в колбу Бунзена в вакууме. В качестве фильтрующего материала используют серо-шинельное сукно. Получают от первой экстракции 4,860 л водно-спиртового извлечения, от второй экстракции 4,7 л водно-спиртового извлечения, от третьей экстракции получают 4,8 л водно-спиртового извлечения.

Полученные водно-спиртовые извлечения упаривают до  $1/20$  от первоначального объема, последовательно по мере поступления. Водно-кубовые концентраты объединяют и получают водно-кубовый остаток в количестве 0,720 л с плотностью  $\rho=1,05 \text{ г/см}^3$ . К водному кубовому остатку в количестве 0,720 л приливают 0,720 л спирта этилового 96,4% и 0,720 л 1,2-дихлорэтана, реакционную смесь помещают в тубус вместимостью 5,0 л, затем перемешивают и отделяют нижний слой в количестве 0,720 л (1,2-дихлорэтановый экстракт). Обработку 1,2-дихлорэтаном проводят 4 раза по 0,720 л. Получают 1,2-дихлорэтановый экстракт в количестве 2,880 л, который два раза промывают дистиллированной водой по 288 мл.

Промывную воду от дихлорэтана присоединяют к очищенному водному кубовому остатку и упаривают в вакууме до 1,296 л водного кубового остатка. 1,2-дихлорэтановый экстракт выводят из технологического процесса. Очищенный водный кубовый остаток подщелачивают 10-12% водным раствором гидрата окиси натрия до  $\text{pH } 7-7,68$ , получают щелочной раствор с  $\text{pH}=7,61$ , который обрабатывают этилацетатом, насыщенным водой в соотношении как (1:0,5) четыре раза.

Полученные этилацетатные экстракты объединяют и промывают один раз 300 мл дистиллированной водой, затем экстракт высушивают над сернокислым натрием и упаривают в вакууме. Получают 36,8 г суммы фенольных соединений, которую

растворяют в 330 мл этилацетата на водяной бане при температуре 65°C, затем раствор переносят в коническую колбу вместимостью 1,0 л туда же добавляют 330 мл воды дистиллированной (65-70°C) и несколько кристалликов фелламурина.

По мере остывания раствора начинается кристаллизация, затем колбу с раствором помещают в холодильник. Образовавшийся кристаллический осадок фильтруют в вакууме, переносят в химический стакан, к осадку приливают холодный этилацетат (150 мл), перемешивают и фильтруют в вакууме, а затем сушат и получают технического флакозида 22,91 г. Затем проводят перекристаллизацию технического продукта. 22,91 г флакозида помещают в круглодонную колбу, приливают 120 мл 96,3% спирта этилового и растворяют на водяной бане при температуре 70°C, туда же в колбу добавляют 120 мл горячей (70°C) воды дистиллированной и вращают колбу на водяной бане до полного растворения, затем реакционную смесь фильтруют через складчатый бумажный фильтр самотеком в плоскодонную колбу вместимостью 500 мл, круглодонную колбу ополаскивают 50 мл горячего 50% водного этанола и присоединяют к фильтрату, добавляют несколько кристалликов фелламурина, охлаждают при комнатной температуре, помещают в холодильник и через 3-4 часа получают кристаллический продукт, который отфильтровывают в вакууме, переносят в химический стакан, к осадку приливают охлажденный 50% водный спирт этиловый в количестве 150 мл, тщательно перемешивают и фильтруют в вакууме.

Полученный влажный готовый продукт сушат в вакуум-сушильном шкафу при температуре 70°C в течение 4 часов. Получают 14,23 г готового продукта «флакозида» с содержанием основного вещества 97,38%. Выход готового продукта от начала процесса 70,0%.

Полученная субстанция флакозид представляет собой мелкокристаллический порошок от белого цвета или белого с бежеватым оттенком, содержащий в качестве доминирующего компонента фелламурин. «Флакозид» используют для приготовления таблеток.

Пример 3. Определение цитотоксической активности флакозида.

Цитотоксическую активность флакозида оценивали на культурах опухолевых клеток K562 (эритролейкемия человека) получена из биоколлекции ФГБНУ ВИЛАР (<https://ru.cytogen.ru>), чувствительных к цитостатикам и нормальных клеток. В качестве нормальных клеток использовали быстроделющиеся фибробласты кожи крыс. Цитотоксическую активность флакозида определяли спектрофотометрическим методом МТТ. Данная клеточная культура является стандартным объектом оценки цитотоксического действия противоопухолевых соединений (Федеральное руководство по доклиническому испытанию лекарственных средств, 2014). Культивирование клеток осуществлялось в стерильных условиях с использованием ламинарбокса ЛБ-В (Россия). Клетки инкубировали при 37 С в условиях 5% CO<sub>2</sub>. При культивировании клеток использовали стандартную среду DMEM с глутамином (Dulbecco's Modified Eagle medium, ПанЭко, Россия) с добавлением 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США), антибиотиков гентамицина сульфата и стрептомицина сульфата (ООО «БиоХимФарм», Россия).

Жизнеспособность клеток определяли методом МТТ. Клетки выращивали в 25 см флаконах, после достижения монослоя проводили трипсинизацию и вносили по 200 мкл клеточной суспензии 10 тыс клеток на 1 мл в лунки плоскодонного планшета «COSTAR» и добавляли исследуемое вещество - флакозид на 24 ч. После инкубации в культуральную среду на 3 ч вносили 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий

бромистый (МТТ) до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Общий объем лунки составлял 200 мкл, по 2 тыс клеток на лунку. Затем жидкость из лунок удаляли пипетированием и вносили по 150 мкл диметилсульфоксида на 30 мин. МТТ восстанавливается за счет действия дегидрогеназ живых клеток до водонерастворимых кристаллов формазана.

5 Оптическую плотность образцов регистрировали при длине волны 530 нм на планшетном анализаторе иммуноферментных реакций "УНИПЛАН" АИФР-01 (Россия). Оптическую плотность контрольных образцов (без тестируемого препарата) принимали за 100% выживаемость клеток, равную единице. Представлены данные трех экспериментов (n=4).

10 Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью программы GraphPadPrism 6. Достоверность отличий (P) оценивали по критерию Стьюдента-Фишера (см. табл. 1).

Показано, что флакозид оказывает дозозависимое цитотоксическое действие на опухолевые клетки K562. Максимальный цитотоксический эффект проявлялся в  
15 концентрации 100 мкМ - 64% ингибирование жизнеспособности опухолевых клеток.

Литература:

1. Государственный реестр лекарственных средств-Том 1. - М. - 2004. - С. 80,441.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Часть II. - М.: «Медицина». - 1993. - С. 401.
- 20 3. Шретер А.И. Целебные растения Дальнего Востока и их применение /А.И. Шретер - Владивосток: Дальневосточное книжное изд-во ИПК «Дальпресс», 2000. - 144 с.
4. Фатеева Т.В., Дерябин П.Г., Бортникова В.В., Крепкова Л.В., Мизина П.Г. Активность флакозида при вирусном гепатите С в экспериментах invitro // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2019. - Т. 167. - №4. С. 463-466.
- 25 5. Карабаева В.В., Крепкова Л.В., Бабенко А.Н., Бортникова В.В., Фатеева Т.В., Мизина П.Г., Михеева Н.С., Карабаева О.Н. Ретроспективный анализ экспериментального и клинического изучения флакозида при вирусных гепатитах // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021. Т. 10. №4. С. 169-176.
6. Патент РФ №2401121.
- 30 7. Патент РФ №2200569.
8. Патент РФ №2200571.
9. Патент РФ №2200570.
10. Бортникова В.В., Карабаева В.В., Крепкова Л.В., Мизина П.Г., Бабенко А.Н., Михеева Н.С., Карабаева О.Н. Ретроспективный анализ клинического изучения  
35 лекарственного препарата «Флакозид» в терапии заболеваний гепатобилиарной системы. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021;10(3):100-104. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-3-100-104>: // [HYPERLINK "https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-3-100-104" doi HYPERLINK "https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-3-100-104". HYPERLINK "https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-3-100-104"org](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-3-100-104)  
40 [HYPERLINK "https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-3-100-104"/10.33380/2305-2066-2021-10-3-100-104](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-3-100-104)
11. Патент РФ №2391989.
12. Противовирусные органические соединения: учеб. пособие / Е.Н. Уломский, В.Л. Русинов, О.Н. Чупахин; [науч. ред. В.Н. Чарушин]; М-во образования и науки Рос.  
45 Федерации, Урал. федер. ун-т. - Екатеринбург: Изд-во Урал, ун-та, 2017. - 92 с.
13. Zhang H., Jiang H., Zhang H., Liu J., Hu X., Chen L. Anti-tumor efficacy of phellamurin in osteosarcoma cells: Involvement of the PI3K/AKT/mTOR pathway // European Journal of Pharmacology. 2019.172477. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172477.

14. Бортникова В.В., Крепкова Л.В. Экспериментальное токсикологическое изучение противовирусного фитопрепарата Флакозид // Вестник РУДН, серия Медицина, 2008, №7, С. 96-101.

15. В.И. Глызин. Докторская диссертация, 1974. Получение лекарственных препаратов противовирусной активности из группы природных флавоноидов.

Таблица 1. Влияние флакозида на жизнеспособность опухолевых клеток K562.

Показатели	Флакозид 10 <sup>-3</sup> М	Флакозид 10 <sup>-4</sup> М	Флакозид 10 <sup>-5</sup> М	Флакозид 10 <sup>-6</sup> М	Флакозид 10 <sup>-7</sup> М	Конт- роль
	0,332	0,34	0,57	0,71	0,68	0,77
	0,31	0,30	0,68	0,57	0,60	0,65
	0,30		0,53	0,69	0,55	0,65
	0,29	0,11	0,45	0,63	0,57	0,66
средняя оптическая плотность	0,31	0,25	0,56	0,65	0,60	0,68
Статистичес- кое отклонение	0,02	0,12	0,10	0,06	0,06	
В процентах от контроля	45,14	36,60	81,50	95,56	88,37	100,00
Статистичес- кое отклонение	2,58	17,91	14,47	9,19	8,36	8,91

(57) Формула изобретения

Способ получения лекарственной субстанции из листьев бархата амурского (Phellodendron amurense Rupr) и листьев бархата амурского Лавалея (Phellodendron amurense var.Lavallei (Dode) Spague) семейства Рутовых (Rutaceae), включающий трехкратную экстракцию высушенного и измельченного сырья водным этиловым спиртом при соотношении сырье : экстрагент, равном 1:10, в концентрации 40-60% при температуре 20-60°C в течение двух часов, подачу на каждую последующую экстракцию свежего экстрагента в количестве, равном слитому извлечению, упаривание полученных экстрактов последовательно по мере поступления до объема 1/20, объединение водных кубовых концентратов и их обработку четыре раза смесью 1,2-дихлорэтаном с этиловым спиртом в соотношении 1:1:1, упаривание остатков органического растворителя, подщелачивание водных кубовых остатков 10-12% водным раствором гидрата окиси натрия до pH 7-7,68, четырехкратную обработку водных щелочных растворов этилацетатом в соотношении 1:0,5, объединение этилацетатных экстрактов, промывку водой, сушку над серноокислым натрием и упаривание, получение технического продукта флакозида кристаллизацией из смеси этилацетат : вода охлаждением, с последующей

фильтрацией и промывкой охлажденным этилацетатом, сушку технического продукта, перекристаллизацию из водного этилового спирта и получение готового лекарственного средства флакозида.

5

10

15

20

25

30

35

40

45