



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
B01D 11/00 (2020.02); *C11B 1/10* (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019132883, 16.10.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.10.2019

Дата регистрации:
23.06.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.10.2019

(45) Опубликовано: 23.06.2020 Бюл. № 18

Адрес для переписки:
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6, КемГУ,
Центр сопровождения НИ

(72) Автор(ы):

Просеков Александр Юрьевич (RU),
Бабич Ольга Олеговна (RU),
Дышлок Любовь Сергеевна (RU),
Асякина Людмила Константиновна (RU),
Милентьева Ирина Сергеевна (RU),
Заушинцева Александра Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Кемеровский государственный
университет" (КемГУ) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: UA 33180 U, 10.06.2008. RU 2526165
C1, 20.08.2014. RU 2708260 C1, 05.12.2019.

(54) СПОСОБ ЭКСТРАКЦИИ КОМПЛЕКСА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ
БИОМАССЫ КОРНЕВОЙ КУЛЬТУРЫ IN VITRO ЛАПЧАТКИ БЕЛОЙ (*POTENTILLA ALBA L.*)

(57) Реферат:

Изобретение относится к пищевой промышленности и касается способа. Способ получения экстрактов биологически активных веществ из биомассы клеточных культур растений in vitro лапчатки белой (*Potentilla alba L.*) предусматривает высушивание и измельчение биомассы корневой культуры in vitro лапчатки белой (*Potentilla alba L.*) с последующим экстрагированием 70%-ным водным раствором этанола, фильтрованием экстракта, центрифугированием фильтрата и выпариванием

растворителя. При этом экстрагирование проводят при соотношении растительного сырья и экстрагента 1:20-1:5 при комнатной температуре в течение 360-120 мин, а фильтрат дополнительно центрифугируют при 3900 об/мин. Изобретение позволяет получить комплекс биологически активных веществ из биомассы корневой культуры in vitro лапчатки белой (*Potentilla alba L.*), причем процесс экстракции биологически активных веществ осуществляют при пониженной (комнатной) температуре. 1 ил., 1 табл., 3 пр.

RU
2 7 2 4 4 8 7
C 1

RU
2 7 2 4 4 8 7
C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
B01D 11/00 (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
B01D 11/00 (2020.02); C11B 1/10 (2020.02)

(21)(22) Application: **2019132883, 16.10.2019**

(24) Effective date for property rights:
16.10.2019

Registration date:
23.06.2020

Priority:

(22) Date of filing: **16.10.2019**

(45) Date of publication: **23.06.2020 Bull. № 18**

Mail address:
**650000, g. Kemerovo, ul. Krasnaya, 6, KemGU,
Tsentr soprovozhdeniya NI**

(72) Inventor(s):

**Prosekov Aleksandr Yurevich (RU),
Babich Olga Olegovna (RU),
Dyshlyuk Lyubov Sergeevna (RU),
Asyakina Lyudmila Konstantinovna (RU),
Milenteva Irina Sergeevna (RU),
Zaushintsena Aleksandra Vasilevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Kemerovskij gosudarstvennyj
universitet" (KemGU) (RU)**

(54) **METHOD OF EXTRACTING A COMPLEX OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM BIOMASS OF ROOT CULTURES OF POTENTILLA ALBA L_ IN VITRO**

(57) Abstract:

FIELD: food industry.

SUBSTANCE: invention relates to food industry and method. Method of producing extracts of biologically active substances from biomass of cell cultures of plants in vitro of *Potentilla alba L.* provides for drying and milling biomass of root culture in vitro of *Potentilla alba L.* with subsequent extraction by 70 % aqueous solution of ethanol, filtration of extract, centrifugation of filtrate and evaporation of solvent. Extraction is carried out at ratio of vegetal raw material

and extragent 1:20–1:5 at room temperature for 360–120 min, and filtrate is additionally centrifuged at 3,900 rpm.

EFFECT: invention enables to obtain a complex of biologically active substances from the biomass of the root culture in vitro of the *Potentilla alba L.*, wherein the biologically active substances extraction process is carried out at a low (room) temperature.

1 cl, 1 dwg, 1 tbl, 3 ex

C 1
7
8
4
4
2
2
7
R U

R U
2
7
2
4
4
8
7
C 1

Изобретение относится к биотехнологической промышленности и касается способа получения экстрактов биологически активных веществ (БАВ) из биомассы клеточных культур растений *in vitro*.

Лапчатка белая (*Potentilla alba* L., семейство Розоцветные - *Rosaceae*) представляет 5
значительный интерес в связи с накоплением большого количества вторичных метаболитов. Биологически активными составляющими лапчатки белой являются такие компоненты, как флавоноиды, регулирующие проницаемость и эластичность стенок кровеносных сосудов, предотвращающие атеросклеротические изменения, 10
нейтрализующие свободные радикалы, фенолкарбоновые кислоты, обладающие антимуtagenными и мочегонными свойствами, и сапонины, гликозиды, имеющие кардиотоническое, нейротропное, гипохолестеринемическое, кортикотропное, адаптогенное и седативное действие [1-3].

Природные лекарственные препараты имеют основной недостаток: ограниченность природных источников, крупномасштабное использование которых влечет за собой 15
вполне определенные экологические проблемы [4]. Поэтому важнейшей задачей для развития фармацевтической и пищевой промышленности является обеспечение возобновляемым сырьем с необходимыми свойствами.

Проблему дефицита растительного сырья редких и исчезающих видов растений позволяет решить использование вместо интактных растений культур клеток, тканей 20
и органов *in vitro* лекарственных растений (калусных, суспензионных и корневых культур - так называемых «бородатых корней», "hairy roots") в качестве «фабрик» для производства БАВ.

Технологии *in vitro* имеют ряд преимуществ перед традиционным сбором сырья лекарственных растений, которые состоят в возможности круглогодичного получения 25
ценных метаболитов в контролируемых условиях, обеспечивающих стандартизацию процесса. Поскольку в большинстве случаев биосинтез вторичных метаболитов в калусных и суспензионных культурах протекает не так активно, как в исходных растениях, наиболее перспективной системой *in vitro* является корневая культура. Культуры "hairy roots" способны продуцировать как ценные метаболиты, характерные 30
для исходного растения, так и новые вещества, являющиеся их предшественниками или производными. Следует отметить, что уровень биосинтеза этих веществ сопоставим, а в некоторых случаях превышает уровень их биосинтеза в интактных растениях [5].

Из уровня техники известно противовирусное средство на основе экстракта культуры «бородатых корней» ("hairy roots") селитрянки Шюбера (*Nitraria schoberi* L.), где 35
предложен способ получения сухого экстракта из культуры "hairy roots" *Nitraria schoberi* L. методом высушивания этанольного извлечения из измельченного и гомогенизированного сырья (патент РФ №2615376, опубл. 04.04.2017). Для этого 5 г измельченного и гомогенизированного сухого сырья культуры "hairy roots" *Nitraria schoberi* L. суспендируют в 100 мл 70%-ного водного раствора этанола трехкратно в 40
течение 8 ч общего времени экстрагирования при температуре 60°C. Затем объединенные охлажденные экстракты фильтруют через стеклянные фильтры, выпаривают на ротационном испарителе и высушивают при температуре 60°C в сушильном шкафу.

В качестве недостатков предложенного способа следует отметить высокую продолжительность экстракции и высокую температуру процесса.

Так же из уровня техники известно средство, обладающее гемостимулирующим, 45
антимуtagenным, противоопухолевым, церебропротекторным, антигипоксическим, ноотропным, анксиолитическим и противоневротическим действием, которое представляет собой продукт экстрагирования "hairy roots" культуры корней шлемника

байкальского *Scutellaria baicalensis* Georg 70%-ным этанолом при следующих условиях: продолжительность 1-3 ч, соотношение сырье : экстрагент 1:20, температура 80-85°C (патент РФ №2438691, опубл. 10.01.2012).

Основными недостатками заявленного способа являются высокая температура экстракции и низкий выход экстрактивных веществ.

Задачей настоящего изобретения является получение комплекса биологически активных веществ из биомассы корневой культуры *in vitro* лапчатки белой (*Potentilla alba* L.), причем процесс экстракции биологически активных веществ осуществляют при пониженной температуре.

Ранее коллективом Научно-исследовательского института биотехнологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» предложен способ получения корневой культуры *in vitro* *Potentilla alba* L. - продуцента флавоноидов (заявка на выдачу патента на изобретение РФ №2019108252 от 06.05.2019). По этому способу получают биомассу корневой культуры *in vitro* *Potentilla alba* L. Далее биомассу корневой культуры *in vitro* *Potentilla alba* L. направляют на сушку, измельчают в ступке и подвергают экстрагированию 70%-ным водным раствором этанола при соотношении растительного сырья и экстрагента 1:20-1:5 при комнатной температуре в течении 360-120 мин. Сухую массу отделяют от раствора фильтрованием, фильтрат дополнительно центрифугируют для удаления взвешенных частиц. Растворитель из экстракта упаривают с помощью ротационного испарителя. Колбу взвешивают и определяют выход экстракта.

Остаток растворяют в минимальном объеме 70%-ного этанола и фракционный состав полученного раствора исследуют методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). В случае использования ТСХ на силикагеле без модификации хроматографию проводят в градиентном режиме в системе $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ с градиентом метанола 0-10%, с шагом в 1 %. В случае обращенно-фазовой хроматографии используют элюентную систему $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ с градиентом ацетонитрила 0-20% с шагом 2%, в качестве модификатора используют трифторуксусную кислоту.

На фиг. 1 приведены результаты ТСХ-анализа экстракта биомассы корневой культуры *in vitro* лапчатки белой.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1.

Биомассу корневой культуры *in vitro* *Potentilla alba* L. направляют на сушку в сушильном шкафу при 100°C, измельчают в ступке и подвергают экстрагированию 70%-ным водным раствором этанола. Для этого навеску 4 г сухого растительного сырья помещают в пластиковую пробирку объемом 100 мл, добавляют 40 мл 70%-ного этанола, помещают на шейкер и перемешивают в течение 240 мин. Сухую массу отделяют от раствора фильтрованием, фильтрат дополнительно центрифугируют при 3900 об/мин. для удаления взвешенных частиц. Растворитель из экстракта упаривают при пониженном давлении из предварительно взвешенной колбы объемом 100 мл с помощью ротационного испарителя RV 10 digital V-C (ИКА, Германия). Колбу взвешивают и определяют выход экстракта.

Остаток растворяют в 1 мл 70%-ного этанола и фракционный состав полученного раствора исследуют методом тонкослойной хроматографии. Для этого каплю полученного раствора наносят на пластинку для тонкослойной хроматографии с помощью стеклянного капилляра. Пластинку помещают в камеру для ТСХ, в которую добавляют соответствующий элюент. В случае использования ТСХ на силикагеле без модификации хроматографию проводят в градиентном режиме в системе $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$

с градиентом метанола 0-10%, с шагом в 1%. В случае обращенно-фазовой хроматографии используют элюентную систему H₂O:MeCN с градиентом ацетонитрила 0-20% с шагом 2%, в качестве модификатора используют трифторуксусную кислоту, которую добавляют в количестве 0,1%.

5 Пример 2

Аналогичен примеру 1, но для экстрагирования используют 20 мл 70%-ного водного раствора этанола, а процесс экстракции ведут в течение 360 мин.

Пример 3

10 Аналогичен примеру 1, но для экстрагирования используют 80 мл 70%-ного водного раствора этанола, а процесс экстракции ведут в течение 120 мин.

В результате исследования экстракта лапчатки белой удалось с высокой селективностью выделить фракции, обогащенные астрагалином, монохаетином, кверцитин-3,7-дигликозидами (фиг. 1).

15 Результаты определения суммарного выхода индивидуальных БАВ, извлеченных из биомассы корневой культуры *in vitro* лапчатки белой, представлены в таблице 1.

Таблица 1

20 Результаты определения суммарного выхода индивидуальных БАВ, извлеченных из биомассы корневой культуры *in vitro* лапчатки белой

Номер примера	Суммарный выход индивидуальных БАВ, % от исходной биомассы корневой культуры
Пример 1	0,45±0,02
Пример 2	0,41±0,02
Пример 3	0,34±0,02

30 Таким образом, при реализации предлагаемого изобретения достигается получают комплекс биологически активных веществ из биомассы корневой культуры *in vitro* лапчатки белой (*Potentilla alba* L), причем процесс экстракции биологически активных веществ осуществляют при пониженной (комнатной) температуре.

Источники информации:

35 1. Сравнительная оценка накопления фенольных соединений в надземных и подземных органах лапчатки в условиях Беларуси / Ж.А. Рупасова, В.А. Игнатенко, Т.И. Василевская и др. // Бюллетень Главного ботанического сада. - 2002. - Вып. 183. - С. 34.

40 2. Семенова, Е.Ф. Химический состав лапчатки белой и применение ее с лечебной целью / Е.Ф. Семенова, Е.В. Преснякова // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. - 2001. - №5. URL: http://chem.kstu.ru/butlerov_comm/vol2/cd-a2/data/jchem&cs/russian/n5/1vr103/103.htm.

3. Роговский, В.С. Перспективы применения препаратов кверцетина для профилактики и лечения атеросклероза / В.С. Роговский, А.И. Матюшин, Н.Л. Шимановский // Международный медицинский журнал. - 2011. - Т. 17. - №3. - С. 114-118.

45 4. Племенков, В.В. Природные соединения - основной базис поиска химиотерапевтических субстанций // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы IV Всероссийской научной конференции. - Барнаул. - 2009. - Т. 2. - С. 11-14.

5. Sevon, N. Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation: root cultures as source of alkaloids / N. Sevon, K.M. Oksman-Caldentey // Planta Med. - 2002. - V. 68. - P. 859-868.

(57) Формула изобретения

5 Способ экстракции комплекса биологически активных веществ из биомассы корневой культуры *in vitro* лапчатки белой *Potentilla alba* L., включающий экстрагирование высушенной биомассы корневой культуры *in vitro* лапчатки белой 70%-ным водным раствором этанола, фильтрование экстракта, выпаривание растворителя, отличающийся тем, что экстрагирование проводят при соотношении растительного сырья и экстрагента
10 1:20-1:5 при комнатной температуре в течение 360-120 мин, а фильтрат дополнительно центрифугируют при 3900 об/мин.

15

20

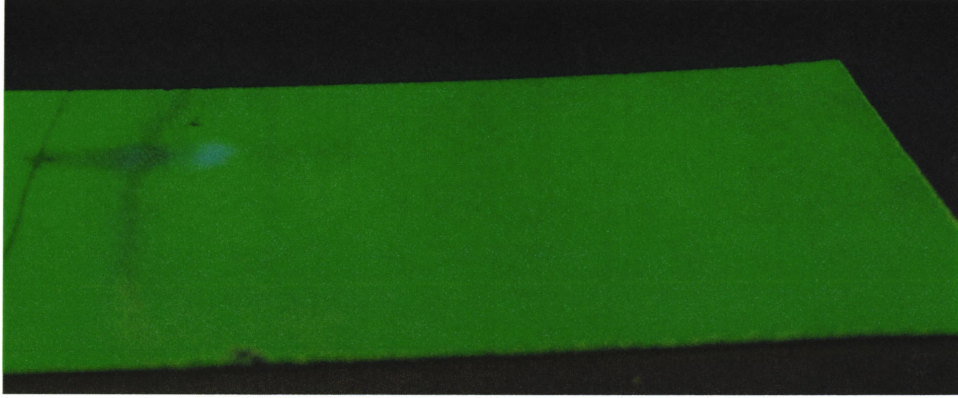
25

30

35

40

45



Фиг. 1