



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014150834/15, 11.12.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
11.12.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.12.2014

(45) Опубликовано: 20.11.2015 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Dong-Mei Li et al. Extraction, structural characterization and antioxidant activity. of polyhydroxylated 1,4-naphthoquinone pigments from spines. of sea urchin *Glyptocidaris crenularis* and *Strongylocentrotus intermedius* // Eur Food Res Technol (2013) 237:331"339. RU 2441661 C1, 10.02.2012. RU 2362573 C1, 27.07.2009. RU 2411939 C1, 20.02.2011. Рогов (см. прод.)

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100 лет  
Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН, зав.  
патентным отделом Стадниченко Н.И.

(72) Автор(ы):

Купера Елена Владимировна (RU),  
Артюков Александр Алексеевич (RU),  
Рудцова Татьяна Анатольевна (RU),  
Кочергина Татьяна Юрьевна (RU),  
Маханьков Вячеслав Валентинович (RU),  
Козловская Эмма Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ 2,3,7-ТРИОКСИЮГЛОНА (СПИНОХРОМА В)

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к способу получения пигмента спинохрома В. Способ характеризуется тем, что в качестве сырья используют панцирь и иглы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, которые дефростируют или отделяют от консерванта декантацией, промывают водой, обезжиривают этиловым спиртом, высушивают, измельчают, деминерализуют концентрированной фосфорной кислотой с последующим добавлением дистиллированной воды, затем экстрагируют трехкратно этиловым спиртом, полученный экстракт пропускают через колонку с хитозаном, элюат упаривают, остаток растворяют в дистиллированной воде, фильтруют,

пропускают через колонку с полихромом-1, промывают колонку дистиллированной водой, элюируют целевой продукт водным раствором этилового спирта, упаривают досуха, растворяют в этилацетате, высаждают целевой продукт гексаном, отфильтровывают и высушивают. Вышеописанный способ обеспечивает расширение спектра биологически активных веществ, получаемых из отходов промышленной переработки промысловых морских ежей *S. intermedius*, позволяет получать индивидуальное соединение - спинохром В, являющееся эффективным антиоксидантом и проявляющее антиаллергические свойства. 3 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

А.М. Выделение пигментов из панциря морского ежа для применения в кровяной колбасе // I Научно-практическая студенческая конференция по итогам научно-исследовательской работы Школы

биомедицины ДВФУ за 2012"2013 годы : сборник материалов / Дальневосточный федеральный университет, Школа биомедицины ; [отв. ред. С.Н. Павлинич]. " Владивосток : Дальневост. федерал. ун-т, 2013, с. 25-28 (<http://www.dvfu.ru/documents/41151/6f74a2ba-a9bf-4dc3-a654-3a09b4eee849>). KR20020000660 А, 05.01.2002.

R U 2 5 6 8 6 0 4 C 1

R U 2 5 6 8 6 0 4 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 31/122* (2006.01)  
*A61K 35/56* (2015.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2014150834/15, 11.12.2014

(24) Effective date for property rights:  
11.12.2014

Priority:

(22) Date of filing: 11.12.2014

(45) Date of publication: 20.11.2015 Bull. № 32

Mail address:

690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let Vladivostoku,  
159, TIBOKh DVO RAN, zav. patentnym otdelom  
Stadnichenko N.I.

(72) Inventor(s):

**Kupera Elena Vladimirovna (RU),  
Artjukov Aleksandr Alekseevich (RU),  
Rutskova Tat'jana Anatol'evna (RU),  
Kochergina Tat'jana Jur'evna (RU),  
Makhan'kov Vjacheslav Valentinovich (RU),  
Kozlovskaja Ehmma Pavlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoj khimii im. G.B. Eljakova  
Dal'nevostochnogo otdelenija Rossijskoj  
akademii nauk (TIBOKh DVO RAN) (RU)**

(54) **METHOD FOR PRODUCING 2,3,7-TRIOXYJUGLONE (SPINOCHROME B)**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: raw material is sea urchin's (Strongylocentrotus intermedius) shell and spines, which are defrosted or separated from a preserving agent by decantation, washed in water, defatted by ethanol, dried, ground, demineralised by concentrated phosphoric acid and added with distilled water, extracted three times in ethanol; the produced extract is passed through a chitosan column; the column effluent is boiled off; the residue is dissolved in distilled water, filtered, passed through a polychrome-1 column;

the column is washed with distilled water; the end product is eluted with an aqueous solution of ethanol, evaporated to dryness, dissolved in ethyl acetate; the end product is deposited by hexane, filtered and dried.

EFFECT: extending the range of biologically active substances produced by industrial processing of commercial sea urchins (S intermedius) that makes it possible to produce an individual compound - spinochrome B, which is an effective antioxidant and exhibits the antiallergic properties.

3 dwg, 1 ex

Изобретение относится к технологии переработки природных объектов и касается способа получения пигмента спинохрома В из отходов переработки промысловых морских ежей вида *Strongylocentrotus intermedius*.

Структура спинохрома В впервые была установлена Куродой [Kuroda С, Koyasu К. // Proceedings of the Imperial Academy. 1944. V. 20. N. 1. P. 23-25.] и подтверждена Андерсоном [Anderson H.A. et al. // Comp.Biochem. Physiol. 1969. V. 28. P. 333-345]. Показано, что доминирующим пигментом промыслового морского ежа *S. intermedius* является спинохром В [Li D. - M. et al. // Eur. Food Res. Technol. DOI 10.1007/s00217-013-1996-8].

Известно, что пигменты морских ежей являются эффективными антиоксидантами. Антиоксидантные свойства спинохромов были изучены на моделях инициированного окисления алкилбензолов, термического окисления метиленолеата и окисления минеральных и растительных масел. Константа взаимодействия спинохромов с перекисными радикалами существенно превышает эффект ионола и природного антиоксиданта токоферола [Кольцова Е.А. и др. Хиноидные пигменты иглокожих // Рукопись деп. ВИНТИ. 1974. №106. С. 74; Карпов Р.С., Дудко В.А. Атеросклероз: патогенез, клиника, функциональная диагностика, лечение // Томск.: Изд. STT, 1998. 672 с.]. Кроме того, нафтохиноны проявляют цитотоксическую активность в отношении различных линий опухолевых клеток [Thomson R.H. Naturally Occurring quinones // London N-Y: Academic Press, 1971. 2 ed. p 257-276].

Наряду с известными антиоксидантами морских ежей, такими как эхинохром А, спинохром А, спинохром Е [RU 2283298 C1, 10.09.2006; Лебедев А.В. и др. // Вопросы медицинской химии. 1999. Т: 45(2). С. 123-130; RU 2362573 C1, 27.07.2009, RU 2411939 C1, 20.02.2011], спинохром В проявляет антиоксидантную активность [Li D. - M. et al. // Eur Food Res Technol DOI 10.1007/s00217-013-1996-8; Kuwahara R. et al. // Food Science and Technology. 2010. V. 43. P. 1185-1190; Pozharitskaya O.N. et al. // Planta Med. 2013. V. 79 (18). P.1698-1704].

Кроме антиоксидантной активности спинохром В проявляет ярко выраженные антиаллергенные свойства. В настоящее время аллергии различной этиологии являются широко распространенными заболеваниями. Спинохром В оказался эффективным при лечении аллергического конъюнктивита и местных раздражений кожи [Pozharitskaya O.N. et al. // Planta Med. 2013. V. 79(18). P. 1698-1704].

Известен способ получения пигментов из панцирей красных морских ежей *Strongylocentrotus franciscanus* [Amarowicz R. et al. // Food Chemistry. 1994. V. 51 P. 227-229]. Замороженное сырье оттаивают, внутренние органы удаляют, панцири промывают холодной водой, высушивают на воздухе при 20°C в течение 24 ч, сухие панцири измельчают в блендере. Размолотые панцири растворяют в 10%-ной HCl при комнатной температуре, затем экстрагируют диэтиловым эфиром (1:1 по объему), эфирный слой промывают водой, высушивают над безводным сульфатом натрия. Растворитель удаляют потоком азота. Осадок растворяют в метаноле, помещают на колонку с Sephadex LH-20 и элюируют метанолом. Идентификация состава проводится на спектрофотометре. Определяли фракцию, содержащую спинохром В, по абсорбционному максимуму при 270, 324 и 464 нм.

Известен способ получения суммы хиноидных пигментов из морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* путем дефростации замороженного сырья, удаления внутренностей, промывки водой, высушивания, измельчения, растворения в концентрированной соляной кислоте, экстрагирования серным эфиром, промывания эфирного слоя 10%-ным NaCl, упаривания, растворения в этиловом спирте,

концентрирования и разделения методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на стеклянных пластинках с кизельгелем в системе: хлороформ: метанол: уксусная кислота: вода, высушивания, элюирования метанолом и идентификацией методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). [Shikov A.N. et al. // Journal of Chromatography A. 2011. V 1218. P. 9111-9114].

Однако известные способы не обеспечивают получения индивидуального пигмента - спинохрома В, в них используются высокотоксичные и пожароопасные растворители - диэтиловый эфир и метанол. Они относятся к лабораторно-аналитическим способам получения суммы хиноидных пигментов и не пригодны для технологических целей.

В качестве прототипа выбран способ получения спинохрома В из игл морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* [Li D. - M. et al. // Eur Food Res Technol DOI 10.1007/s00217-013-1996-8]. Собранные иглы промывают холодной водой, лиофилизируют и измельчают до порошкообразного состояния. Порошок растворяют в водном растворе неорганической кислоты, центрифугируют, нейтрализуют и повторно центрифугируют. Хроматографию образца проводят в статическом режиме на полярной макропористой смоле, соотношение сорбент - образец 1:10. Десорбцию проводят этиловым спиртом, элюат упаривают на роторном испарителе до удаления этанола.

Разделение спинохромов и идентификацию состава проводят методом ВЭЖХ масс-спектрометрии при 475 нм. Получают образец, содержащий преимущественно спинохром В неопределенной концентрации.

Однако этот способ относится к лабораторно-аналитическим способам. Одноступенчатая хроматография в статическом режиме не дает возможности разделять сумму пигментов на индивидуальные компоненты, поэтому способ-прототип не обеспечивает получения спинохрома В высокой степени очистки. Спинохром В выделен в виде индивидуального вещества только методом ВЭЖХ с целью его идентификации, что неприемлемо в промышленном масштабе. В качестве сырья используют только иглы морских ежей, а не полностью весь биоминеральный панцирь, содержащий идентичный набор спинохромов.

Морские ежи вида *S. intermedius* являются основным промысловым видом япономорского побережья России благодаря значительным запасам биомассы и высоким товарных показателей пищевых гонад [Левин В.С., Коробков В.А. Морские ежи России. Биология, промысел, использование // СПб.: Изд. ДОРН, 2003. 256 с.]. Панцири и иглы морских ежей являются промышленными отходами.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в расширении спектра биологически активных веществ, получаемых из отходов промышленной переработки промысловых морских ежей *S. intermedius*, что обеспечивает технологичность заявляемого способа.

Технический результат заключается также в повышении степени очистки целевого продукта. В результате осуществления заявляемого способа получают индивидуальное соединение - спинохром В, являющееся эффективным антиоксидантом и проявляющее антиаллергические свойства.

Заявляемый способ получения 2,3,7-триоксиюглона (спинохрома В) заключается в следующем.

Панцири с иглами промысловых морских ежей *S. intermedius*, оставшиеся после извлечения гонад, свежие, дефростированные или законсервированные, промывают водой для удаления внутренностей, механических примесей и морских солей. При использовании консервированного сырья консервант предварительно отделяют декантацией. Содержащиеся в сырье вещества липидной природы удаляют

экстракционной промывкой 96%-ным этиловым спиртом с последующей регенерацией этанола. Обезжиренное сырье высушивают на воздухе или в сушильном шкафу с принудительной вентиляцией при температуре 30-40°C. Высушенное сырье измельчают.

5 Затем подготовленное сырье деминерализуют стехиометрическим количеством концентрированной фосфорной кислоты (соотношение сырье: кислота 5:1) с последующим добавлением дистиллированной воды при соотношении кислота: вода 2:(1-0,5) для улучшения отвода образующегося в ходе процесса углекислого газа.

10 Полученный продукт экстрагируют 96%-ным этиловым спиртом трехкратно при соотношении продукт: этанол (1:1,0-1,2) в течение 10-14 ч. Затем спиртовый экстракт интенсивного красного цвета отделяют фильтрованием с последующим центрифугированием. Он содержит суммарный пигментный комплекс морских ежей *S. intermedius* и имеет pH 3-3,5.

15 Далее суммарный спиртовый комплекс спинохромов очищают от посторонних примесей на хитозане. Для этого спиртовые экстракты объединяют и пропускают через хроматографическую колонку, заполненную хитозаном. Остаточная кислотность этанольного экстракта не позволяет полигидроксинафтохинонам сорбироваться на хитозане. Спинохромы проходят колонку с хитозаном без задержки. В то же время содержащиеся в экстракте примесные соединения закрепляются на хитозане. В частности, таким образом, происходит разделение нафтохинонов и бинафтохинонов.

20 Затем этанольный раствор нафтохинонов упаривают досуха, остаток растворяют в дистиллированной воде. Спинохром В выделяют из пигментного комплекса на гидрофобном сорбенте полихром-1. Водный раствор пигментного комплекса, полученный на предыдущей стадии, фильтруют и пропускают через хроматографическую колонку с полихромом-1. Адсорбированные компоненты  
25 отмывают от кислоты дистиллированной водой. Элюирование спинохрома В осуществляют 5%-ным водным раствором этилового спирта. Элюат упаривают в вакууме досуха. Затем сухой остаток растворяют в этилацетате и высаживают спинохром В гексаном. Полученный микрокристаллический осадок отфильтровывают, промывают гексаном и высушивают в вакуумном сушильном шкафу при температуре не выше  
30 60°C.

Технологичность заявляемого способа обеспечивают следующие процедуры.

35 Применение деминерализации отходов промышленной переработки гидробионтов (панцирей и игл морских ежей), а не трудоемкой и не приемлемой в промышленном масштабе процедуры сбора и измельчения игл морских ежей до порошкообразного состояния, как в способе-прототипе.

40 Использование очистки экстракта, содержащего суммарный пигментный комплекс, от примесных соединений на хитозане и колоночной хроматографии на полихrome-1, позволяющей избирательно извлекать спинохром В из суммы пигментов, а не хроматографии на макропористой смоле в статическом режиме, как в способе-прототипе, не имеющей достаточной разрешающей способности для избирательного извлечения индивидуальных соединений из суммы пигментов.

Проведение высаживания спинохрома В гексаном из этилацетата, обеспечивающего получение индивидуального соединения - спинохрома В, что не предусматривает способ-прототип.

45 Для подтверждения чистоты продукта проведен анализ образцов спинохрома В методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

ВЭЖХ проводили на хроматографе «LaChrom» (Merck Hitachi), снабженном УФ детектором L-7400, насосом L-7100, термостатом L-7300, интегратором D-7500 и

колонкой Agilent Technologies Zorbax Eclipse XDB-C18, 5  $\mu\text{m}$  (75 мм×4.6 мм) с защитной колонкой Hypersil ODS, 5  $\mu\text{m}$  (4.0 мм×4.0 мм). Колонку термостатировали при 30°C. Разделение примесей проводили смесью растворителей: А (вода+1% ледяной уксусной кислоты) и В (ацетонитрил+1% ледяной уксусной кислоты) в следующем режиме: 0-5 мин - изократический, 90% А, 10% В; 5-35 мин градиентный, 90-10% А, 10-90% В. Скорость подачи растворителей 1 мл/мин. Детектирование проводили при 270 нм.

На фиг. 1 представлена ВЭЖХ суммы спинохромов *S. intermedius* (элюат с хитозана).

На фиг. 2 представлена ВЭЖХ смеси спинохромов *S. intermedius*, полученной в результате гидрофобной хроматографии на полихrome-1.

На фиг. 3 представлена ВЭЖХ микрокристаллического осадка спинохрома В.

Изобретение иллюстрируется следующим примером.

#### Пример

Панцири с иглами морских ежей *Strongylocentrotus intermedius*, оставшиеся после извлечения гонад, свежие или дефростированные, в количестве 10 кг промывают

питьевой водой для удаления механических примесей, морских солей. Затем сырье обезжиривают 10 л 96%-ного этилового спирта. Спирт этиловый регенерируют. Сырье высушивают в темноте и дробят. Измельченное сырье загружают в реактор-экстрактор, добавляют 2,2 л концентрированной фосфорной кислоты, а затем последовательно, порционно добавляют 1 л дистиллированной воды.

После разложения кальциевого скелета и прекращения газообразования полученный продукт трехкратно экстрагируют 96%-ным этиловым спиртом (3×11 л). Экстракцию проводят в течение 12 ч при комнатной температуре. Затем экстракты, содержащие комплекс нафтохинонов, объединяют, фильтруют через тканевый фильтр и центрифугируют. Полученный спиртовой экстракт имеет рН 3,5.

Далее спиртовой экстракт в количестве 33 л пропускают через колонку с 0,5 кг измельченного хитозана, уравновешенного 96%-ным этиловым спиртом. Примесные соединения сорбируются на хитозане. Регенерацию колонки проводят 2 л 96%-ного этилового спирта.

Затем полученный элюат, содержащий комплекс спинохромов, упаривают в вакууме досуха. Сухой остаток растворяют в 0,5 л дистиллированной воды. Раствор фильтруют и пропускают через колонку с 0,5 кг полихрома-1, уравновешенную дистиллированной водой. При этом пигменты адсорбируются на полихrome-1. Адсорбированные пигменты отмывают от кислоты 2 л дистиллированной воды. Далее элюируют спинохром В с колонки 2 л 5%-ного водного раствора этилового спирта. Полученный элюат упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 0,2 л этилацетата и высаждают спинохром В 0,5 л гексана, осадок отфильтровывают, промывают гексаном и высушивают в вакуумном сушильном шкафу при температуре не выше 60°C.

Выход продукта составляет 2,72 г (0,0272% от веса исходного сырья) с чистотой 80-90%.

#### Формула изобретения

Способ получения 2,3,7-триоксиглона (спинохрома В) из морских ежей *Strongylocentrotus intermedius*, включающий экстракцию и выделение целевого продукта, отличающийся тем, что используют панцирь и иглы морского ежа, которые дефростируют или отделяют от консерванта декантацией, промывают водой, обезжиривают 96% этиловым спиртом, высушивают, измельчают, деминерализуют концентрированной фосфорной кислотой с последующим добавлением дистиллированной воды при соотношении сырье - кислота 5:1, кислота - вода 2:(1-0,5),

затем экстрагируют трехкратно 96%-ным этиловым спиртом в соотношении сырье - этанол 1:(1-1,2) в течение 10-14 ч, полученный экстракт пропускают через колонку с хитозаном, элюат упаривают, остаток растворяют в дистиллированной воде, фильтруют, пропускают через колонку с полихромом-1, промывают колонку дистиллированной  
5 водой, элюируют целевой продукт 5%-ным водным раствором этилового спирта, упаривают досуха, растворяют в этилацетате, высаждают целевой продукт гексаном, отфильтровывают и высушивают.

10

15

20

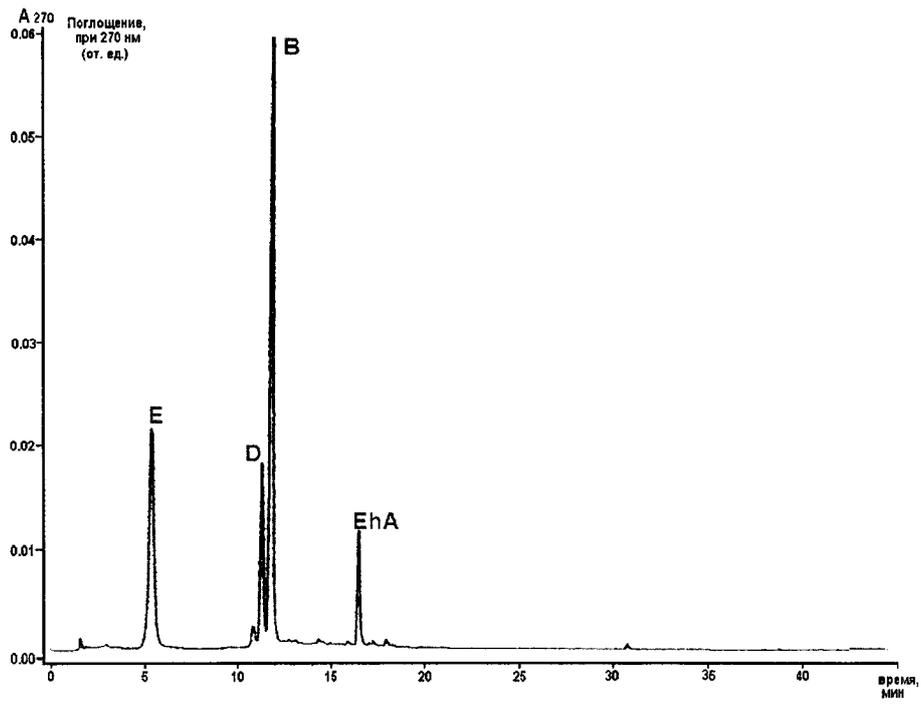
25

30

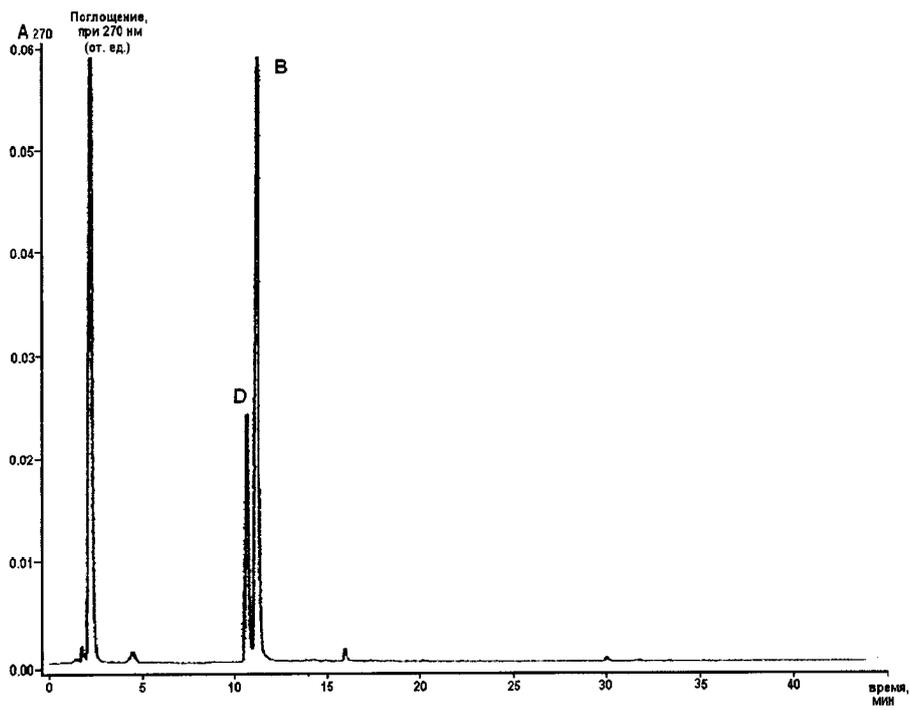
35

40

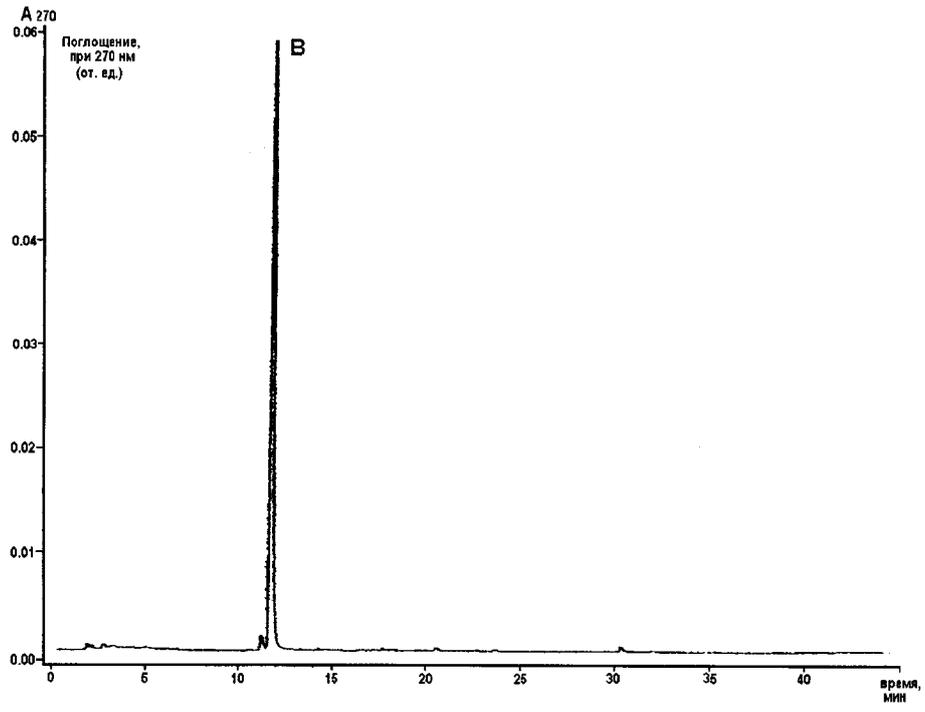
45



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3