



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 054 476** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **C 12 N 1/12, C 07 D 487/22**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 93036361/13, 14.07.1993
(46) Дата публикации: 20.02.1996
(56) Ссылки: Р.Н.Нуннинен, Acta Chem. Scand., 1973, v.27, p.1771 - 1780; "Preparation and purification of Some derivatives of Chlorophylls a and b."

(71) Заявитель:
Малое индивидуальное предприятие "Вета"
(72) Изобретатель: Альбицкая О.Н.,
Ашмаров В.В., Мещерякова А.Л.
(73) Патентообладатель:
Мещерякова Аделия Леонидовна

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ
18-КАРБОКСИ-20-(КАРБОКСИМЕТИЛ)-8-ЭТЕНИЛ-13-ЭТИЛ-2,3-ДИГИДРО-3,7-12,17-ТЕТРАМЕТИЛ-21Н,
23НПОРФИН-2-ПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЛИ ЕЕ СОЛЕЙ

(57) Реферат:
Использование: биотехнология, химико-фармацевтическая промышленность. Сущность изобретения: получение 18-карбобкси-20(карбоксиметил)-8-этенил -13-этил-2,3-дигидро-3,7,12,17 - тетраметил-21Н,23Н порфин -2- пропионовой кислоты или ее солей. Получение хлорина е₆ осуществляют при использовании в качестве сырья биомассы цианобактерий, например, рода Spirulina, полученной путем выращивания в условиях искусственного или

солнечного освещения на питательных средах, имеющих рН 8,0 - 12,0, с предварительной обработкой биомассы спиртовым раствором щелочи. Полученный спиртовой экстракт хлорофилла обрабатывают кислотой с получением феофитина а. Феофитин промывают неполярным растворителем, например гексаном, и подвергают омылению до образования целевого продукта, который осаждают обработкой соляной кислотой. 4 з.п. ф-лы.

RU 2 0 5 4 4 7 6 C 1

RU 2 0 5 4 4 7 6 C 1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 054 476** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl. ⁶ **C 12 N 1/12, C 07 D 487/22**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 93036361/13, 14.07.1993

(46) Date of publication: 20.02.1996

(71) Applicant:

Maloe individual'noe predpriatie "Veta"

(72) Inventor:

**Al'bitskaja O.N.,
Ashmarov V.V., Meshcherjakova A.L.**

(73) Proprietor:

Meshcherjakova Adelija Leonidovna

(54) **METHOD OF PRODUCING 18-CARBOXY-20-(CARBOXYMETHYL)-8-ETHENYL-13-ETHYL-2,3-DIHYDRO-3,7,12,17-TETRAMETHYL-21H,23H-PORPHYRIN-2-PROPIONIC ACID OR ITS SALTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE:
product:

18-carboxy-20-(carboxymethyl)-8-ethenyl-13-ethyl-2,3-dihydro-3,7,12,17-tetramethyl-21H,23H-porphyrin-2-propionic acid or its salts. Chlorophyll e_6 is prepared using cyanobacterium biomass as a raw, for example, of genus *Spirulina* prepared by growing under condition of artificial or solar illumination on nutrient media at pH

8.0-12.0 and with preliminary treatment of biomass with spirituous alkali solution. Prepared spirituous extract of chlorophyll is treated with acid and pheophytin a is

obtained. Pheophytin is washed with nonpolar solvent, for example, hexane and subjected for saponification up to the end product formation which is precipitated with hydrochloric acid. EFFECT: improved method of preparing. 5 cl

RU 2 0 5 4 4 7 6 C 1

RU 2 0 5 4 4 7 6 C 1

Изобретение относится к органической химии, а именно к улучшенному способу получения порфиринов, в частности к способу получения хлорина e_6 (18-карбокситетраэтил-20-(карбоксиметил)-8-этил-13-этил-2,3-дигидро-3,7,12,17-тетраметил-21н, 23н. порфин-2-пропионовой кислоты) или ее солей, которые могут найти применение в химико-фармацевтической промышленности.

Хлорин e_6 относится к классу растительных порфиринов, получаемых на основе хлорофилла a. Известно, что растительные порфирины, в том числе хлорофилл и его производные, являются фармакологически активными соединениями и могут быть использованы в медицинской практике, в том числе как фотосенсибилизаторы для фотодинамической диагностики и терапии онкологических заболеваний. В настоящее время известны способы получения хлорина e_6 , основанные на химических превращениях хлорофилла в целевой продукт.

В частности, наиболее распространен способ получения хлорина e_6 путем обработки хлорофильного экстракта, полученного из соевых бобов, 30%-ной соляной кислотой с получением смеси феофорбидов a и b, которую затем обрабатывают 0,5%-ным метанольным раствором щелочи в вакууме. Целевой продукт извлекают из реакционной массы с помощью эфира.

Известен также способ получения хлорина e_6 из листьев крапивы. Для этого листья крапивы заливают этанолом. В результате получают экстракт, содержащий смесь хлорофиллов a и b. Экстракт обрабатывают

концентрированной соляной кислотой, в результате чего из каждой формы хлорофилла, содержащейся в экстракте, образуется соответствующая форма феофитина a и b. Последующее щелочное

омыление разных форм феофитина приводит к образованию в реакционной массе как минимум двух продуктов хлорина e_6 и родина g_7 . Соотношение этих продуктов составляет 4:1 соответственно. Наряду с этими основными продуктами в реакционной смеси присутствуют их эфиры, а также фитиновые остатки.

Для выделения хлорина e_6 из смеси продуктов реакционную смесь сначала нейтрализуют концентрированной соляной кислотой до pH 7,0, а затем добавляют дополнительно концентрированную соляную кислоту в количестве, соответствующем солянокислоту числу хлорина e_6 . При этом из реакционной смеси извлекают 2/3 растворенного в ней хлорина e_6 .

Расход концентрированной соляной кислоты на очистку хлорина e_6 составляет 120 мл на 1 л реакционной смеси, а всего на получение 1 г хлорина расходуют 2,5 л концентрированной соляной кислоты.

По указанному способу получают 1 г хлорина e_6 из 1 кг сухих листьев крапивы, при этом чистота продукта составляет от 30% до 60% основного вещества. Для получения более чистого целевого продукта используют

метод колоночной хроматографии окиси алюминия (элюент-метилхлорид:бензол (2 к 1)).

Таким образом, в известных методах получения хлорина e_6 на первой стадии технологического цикла используются экстракты хлорофилла, полученные из хлорофиллсодержащих частей высших растений или зеленых водорослей. Известно, что все зеленые растения содержат несколько форм хлорофилла, а именно хлорофиллы a и b. При этом соотношение

отдельных форм хлорофилла у разных растений неодинаково и зависит от приспособляемости растений к различным условиям освещения. У "светлюбивых" растений соотношение хлорофиллов a и b в листьях составляет в среднем 3:1, у "теневыносливых" оно уменьшается.

При обработке зеленых растений органическими растворителями извлекаются все формы хлорофилла (a и b) и при последующей обработке этих экстрактов образуется либо смесь

феофорбидов a и b (по первому способу), либо смесь феофитинов a и b (как указано во втором способе), что в конечном счете приводит к образованию смеси хлорина e_6 и родина g_7 .

Недостатками известных способов получения хлорина e_6 являются сложность технологического процесса, использование больших объемов концентрированной соляной кислоты (2,5 л на 1 г хлорина e_6), небольшой выход и низкая чистота целевого продукта (из 1 кг сухих листьев крапивы получают 1 г хлорина e_6 , чистота которого не выше 60%), использование хроматографического способа очистки целевого продукта. Кроме того, учитывая сложную экологическую обстановку, не исключена возможность загрязнения растительного сырья пестицидами и другими ядохимикатами, и использование спонтанно выросшей биомассы зеленых растений в качестве источника хлорофилла может привести в конечном счете к загрязнению медицинских препаратов.

Целью предлагаемого изобретения является повышение выхода целевого продукта, существенное снижение расхода коррозионно-опасной соляной кислоты и получение целевого продукта чистотой не ниже 90% без использования хроматографической очистки.

Это достигается предлагаемым способом получения хлорина e_6 , заключающимся в том, что в качестве исходного сырья используют биомассу цианобактерий обычно рода *Spirulina*, преимущественно выращенных на свету в контролируемых условиях на искусственных питательных средах, имеющих водородный показатель от 8,0 до 12,0. Биомассу цианобактерий обрабатывают водно-спиртовым раствором щелочи, преимущественно при соотношении вода:спирт как 1 к 2-3 и концентрацией щелочи 10^{-2} - 10^{-3} н. отфильтровывают и экстрагируют хлорофилл "a" этиловым спиртом. Объединенные экстракты

обрабатывают органической или соляной кислотой, образовавшийся

феофитин a отфильтровывают, промывают неполярным органическим растворителем, обычно гексаном.

Щелочной гидролиз

феофитина a проводят в отсутствие кислорода воздуха в спиртовой среде при нагревании. При этом образуются щелочные соли хлорина. После охлаждения реакционную смесь доводят соляной кислотой до pH 6,0-7,0 (расход кислоты 50-55 мл на 1 л реакционной массы, образовавшийся осадок хлорина e_6 отфильтровывают, промывают и сушат до постоянного веса. Хлорин e_6 может быть переведен в соли обычными приемами.

Использование предлагаемого способа позволяет повысить выход целевого продукта по меньшей мере в 3 раза и получить продукт с чистотой не ниже 90%. Кроме того, расход концентрированной соляной кислоты сокращен приблизительно в 10 раз.

Для удаления водорастворимых белков, углеводов и других примесей биомассу цианобактерий предварительно обрабатывают водно-спиртовым раствором щелочи, например, при соотношении воды и спирта 1 к 2-3 и концентрации щелочи 10^{-2} - 10^{-3} н. Для повышения выхода целевого продукта целесообразно согласно заявляемому изобретению использовать биомассу цианобактерий, содержащую (по сухому остатку) 2,0-4,5 мас. хлорофилла формы a, 4,6-62 мас. белков, 4-9 мас.

липидов, 10-20 мас. углеводов, 10-12 мас. зольных элементов.

Дальнейшие цели и преимущества заявляемого изобретения станут ясны из последующего подробного описания способа получения хлорина e_6 и конкретных примеров осуществления этого способа.

В соответствии с заявленным изобретением получение 18-карбокситетра(20-(карбоксиметил)-8-этинил-13-этил-2,3-дигидро-3,7,12, 17-тетраметил-21н.23н. порфин-2-пропионовой кислоты, называемой хлорин e_6 , осуществляют из вещества, содержащего хлорофилл только формы a из биомассы цианобактерий, получаемой при их культивировании на искусственных питательных средах, в условиях солнечного или искусственного освещения.

Монокультуру цианобактерий выращивают в специальных ферментерах закрытого типа, исключающих заражение зелеными водорослями, а следовательно, и попадание в биомассу хлорофилла формы b.

Использование хлорофиллсодержащего растительного сырья стандартного состава, выращенного в альгологически и экологически чистых условиях, гарантирует получение высокой чистоты хлорина e_6 , свободного от следов тяжелых металлов и других примесей, вызванных загрязнением окружающей среды. Это обстоятельство особенно важно при производстве медицинских препаратов.

Биомассу цианобактерий целесообразно обрабатывать горячим водно-спиртовым раствором щелочи, например, при температуре 40-60°C, соотношении воды и спирта 1 к 2-3 и концентрации щелочи 10^{-2} - 10^{-3} н. При такой обработке происходит разрушение клеточных оболочек, удаляются низкомолекулярные фракции углеводов и водорастворимые белки, которые затрудняют последующую экстракцию хлорофилла a и

загрязняют экстракт, а следовательно, целевой продукт. Биомассу после обработки экстрагируют этиловым спиртом, извлекая хлорофилл a. На полученный экстракт

воздействуют минеральной или органической кислотой, например уксусной или соляной, для образования в реакционной массе феофитина a, который выделяют фильтрованием.

Полученный феофитин a, выход которого

составляет 10 г из 1 кг биомассы цианобактерий, промывают неполярным растворителем, например гексаном, для удаления каротиноидов и липидов с поверхности кристаллов феофитина a.

Затем очищенный

феофитин a растворяют и подвергают омылению щелочью в отсутствие кислорода, например, в токе азота. При этом в реакционной массе образуется целевой продукт хлорин e_6 . Для выделения хлорина e_6 реакционную смесь нейтрализуют соляной кислотой, взятой согласно изобретению в количестве 50-55 мл на 1 л реакционной массы до выпадения кристаллов хлорина e_6 , которые отделяют фильтрованием.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет получать из 1 кг биомассы цианобактерий 3,5 г хлорина e_6 с чистотой не менее 90% при расходе концентрированной соляной кислоты в количестве 220 мл на 1 г целевого продукта, что в 10 раз меньше количества кислоты, используемого в способе-аналоге.

Пример 1. Биомассу цианобактерий рода *Spirulina* выращивают в закрытом стеклянном ферментере в условиях солнечного или искусственного освещения на жидкой питательной среде, представляющей собой водный раствор солей, содержащих макро- и микроэлементы, необходимые для интенсивного культивирования цианобактерий. Питательная среда имеет водородный показатель от 8,0 до 12,0. Источником углерода служит углекислый газ, периодически вводимый в питательную среду. После достижения в суспензии определенной концентрации клеток (2,5-3,0 г/л) биомассу цианобактерий отделяют от питательной среды фильтрованием. 1 кг полученной таким образом биомассы цианобактерий с влажностью 75-80% заливают 2,5 л подогретого до 60°C щелочного раствора этилового спирта, полученного при растворении 4 г NaHCO_3 в 1 л дистиллированной воды и последующем смешении с этиловым спиртом в соотношении 1:3 соответственно.

Смесь биомассы с указанным раствором

перемешивают в течение 3-5 мин, после чего фильтруют. Биомассу на фильтре трижды экстрагируют этиловым спиртом, экстракты, содержащие хлорофилл a, суммируют и

обрабатывают ледяной уксусной кислотой из расчета 1,5 мл на 1 л экстракта. Образовавшиеся при этом кристаллы феофитина a фильтруют и промывают гексаном. Выход феофитина a составляет 10 г.

Феофитин a в количестве 10 г растворяют в 3 л спирта при кипячении в токе азота, добавляют 400 г КОН и проводят реакцию омыления в течение 10 мин. После этого смесь нейтрализуют раствором, содержащим 45 мл концентрированной соляной кислоты на 1 л реакционной смеси, до образования кристаллов хлорина e₆.

Реакционную смесь фильтруют. Кристаллы сушат на воздухе без доступа света. Чистота полученного продукта 92%

Пример 2. Используют биомассу цианобактерий, полученную в условиях, аналогичных указанным в примере 1.

1 кг названной биомассы цианобактерий заливают 1,5 л щелочного раствора этилового спирта, который получают при растворении 40 мл 1 н. NaOH в 1 л дистиллированной воды и последующем смешивании с этиловым спиртом в соотношении 1 к 2 соответственно.

Смесь биомассы с указанным раствором перемешивают в течение 3-5 мин, фильтруют, биомассу трижды экстрагируют этиловым спиртом для извлечения хлорофилла a.

Экстракты объединяют и добавляют по 1,2 мл концентрированной HCl на каждый литр экстракта. Образующиеся при этом кристаллы феофитина a фильтруют и промывают на фильтре гексаном. Выход

феофитина a составляет 10 г. 10 г

феофитина a растворяют в 3,3 л этилового спирта при кипячении, затем добавляют 400 г КОН и проводят реакцию омыления в течение 10 мин в вакууме. После этого реакционную смесь нейтрализуют раствором соляной кислоты до pH 6-7. Расход концентрированной соляной кислоты при этом составляет 55 мл.

Кристаллы хлорина e₆ из реакционной смеси фильтруют и сушат. Вес полученного

хлорина 3,6 г. Чистота полученного продукта 91%

Пример 3. Используют биомассу цианобактерий, полученную в условиях, аналогичных указанным в примере 1, при культивировании штамма *Spirulina species Fr-A 127*.

Спиртовой экстракт

хлорофилла a получают, как указано в примере 1. На 1 л этого экстракта добавляют 2 мл 1,0 н. щавелевой кислоты. Образующиеся при этом кристаллы феофитина a фильтруют и промывают на фильтре гексаном. Выход феофитина a составляет 9,7 г.

Полученный феофитин a омыляют, как указано в примерах 1 и 2. Выход хлорина e₆ составляет 3,3 г при чистоте 90%

Формула изобретения:

1. СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ

18-КАРБОКСИ-20-(КАРБОКСИМЕТИЛ)-8-ЭТЕНИЛ-13-ЭТИЛ-2,3-ДИГИДРО-3,7-12,17-ТЕТРАМЕТИЛ-21Н, 23НПОРФИН-2-ПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЛИ ЕЕ СОЛЕЙ, включающий экстракцию хлорофилла из растительного сырья, обработку экстракта кислотой с последующим щелочным гидролизом и выделением целевого продукта в виде кислоты или соли, отличающийся тем, что в качестве исходного сырья используют биомассу цианобактерий, которую предварительно обрабатывают водно-спиртовым раствором щелочи, после обработки экстракта хлорофилла кислотой получаемый продукт отфильтровывают и промывают неполярным органическим растворителем и подвергают щелочному гидролизу в вакууме.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве сырья используют биомассу цианобактерий рода *Spirulina*.

3. Способ по пп.1 и 2, отличающийся тем, что используют биомассу цианобактерий рода *Spirulina*, выращенных на свету в контролируемых условиях на питательных средах, имеющих pH 8,0 - 12,0.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве щелочи используют гидроксиды или карбонаты щелочных металлов.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве неполярного органического растворителя используют гексан.