



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009126951/15, 13.07.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.07.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.07.2009

(45) Опубликовано: 20.02.2011 Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: КОЛЬЦОВА Е.А. и др. **Хиноидные пигменты иглокожих. Главные пигменты некоторых япономорских морских ежей. Деп. ВИНТИ, 1974, №106, с.74. RU 2283298 C1, 10.09.2006. RU 2022959 C1, 15.11.1994. SU 1401828 A1, 27.07.1996. ROKHILO ND et al. Synthesis of echinamines A and B, the first aminated hydroxynaphazarins produced by the sea urchin** (см. прод.)

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100-летия
Владивостоку, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, зав.
патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Артюков Александр Алексеевич (RU),
Купера Елена Владимировна (RU),
Рущкова Татьяна Анатольевна (RU),
Маханьков Вячеслав Валентинович (RU),
Глазунов Валерий Петрович (RU),
Козловская Эмма Павловна (RU),
Кольцова Евгения Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Учреждение Российской академии наук
Тихоокеанский институт биоорганической
химии Дальневосточного отделения РАН
(ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ 2,3,6,7-ТЕТРАГИДРОКСИНАФТАЗАРИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к технологии переработки природных объектов. Для получения 2,3,6,7-тетрагидроксиафтазарина (спинохрома E) в качестве сырья используют отходы переработки промысловых морских ежей *Strongylocentrotus nudus*, которое дефростируют или отделяют от консерванта декантацией. Промывают водой, обезжиривают 96% этиловым спиртом, затем экстрагируют трехкратно 96% этиловым спиртом с добавлением фосфорной кислоты (рН 3,0-3,5) при соотношении сырье: экстрагент 1,0:(1,0-1,2) в течение 12-24 час. Полученный экстракт пропускают через колонку с хитозаном, промывают колонку 96%

этиловым спиртом, затем элюируют пигменты 96% этиловым спиртом с добавлением соляной кислоты (рН 2-4). Далее элюат пропускают через колонку с полихромом-1, промывают колонку дистиллированной водой, затем элюируют целевой продукт 40-50% водным раствором этилового спирта, отгоняют растворитель в вакууме, водный остаток лиофилизируют. Затем спинохром E сублимируют при 195-200°C или перекристаллизовывают из этилового спирта. Способ позволяет расширить спектр биологически активных веществ, получаемых из отходов промышленной переработки промысловых морских ежей. 3 ил.

(56) (продолжение):

Scaphechinus mirabilis and its analogues/ *J Nat Prod.*, 2006, 69(8), p.1125-9, PMID: 16933861, реф., найдено в PubMed, найдено 11.03.2010.

R U 2 4 1 1 9 3 9 C 1

R U 2 4 1 1 9 3 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21)(22) Application: **2009126951/15, 13.07.2009**(24) Effective date for property rights:
13.07.2009

Priority:

(22) Date of filing: **13.07.2009**(45) Date of publication: **20.02.2011 Bull. 5**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100-letija
Vladivostoku, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav.
patentnym otdelom N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Artjukov Aleksandr Alekseevich (RU),
Kupera Elena Vladimirovna (RU),
Rutskova Tat'jana Anatol'evna (RU),
Makhan'kov Vjacheslav Valentinovich (RU),
Glazunov Valerij Petrovich (RU),
Kozlovskaja Ehmma Pavlovna (RU),
Kol'tsova Evgenija Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Uchrezhdenie Rossijskoj akademii nauk
Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj khimii
Dal'nevostochnogo otdelenija RAN (TIBOKh
DVO RAN) (RU)**

(54) METHOD FOR SYNTHESIS OF 2,3,6,7-TETRAHYDROXYNAPHTHAZARIN

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to the technology of processing natural objects. The material used to produce 2,3,6,7-tetrahydroxynaphthazarin (spinochrome E) is wastes from processing sea urchins *Strongylocentrotus nudus*, which are defrosted or separated from a preserving agent through decantation. The raw material is washed with water, degreased with 96% ethyl alcohol and the extracted three times with 96% ethyl alcohol with addition of phosphoric acid (pH 3.0-3.5) with ratio raw material: extraction agent equal to 1.0:(1.0-1.2) for 12-24 hours. The obtained extract is passed through a column with chitosan. The column is

washed with 96% ethyl alcohol and pigments are then eluted with 96% ethyl alcohol with addition of hydrochloric acid (pH 2-4). Further, the eluate is passed through a column with polychrome-1. The column is washed with distilled water and the end product is eluted with 40-50% aqueous solution of ethyl alcohol. The solvent is distilled in a vacuum and the water residue is lyophilised. Spinochrome E is the sublimated at 195-200°C or recrystallised from ethyl alcohol.

EFFECT: method widens the range of biologically active substances obtained from wastes of industrial processing of sea urchins.

3 dwg, 2 ex

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

Полигидроксинафтохинон - 2,3,6,7-тетрагидроксинафтазарин (спинохром Е) впервые обнаружен Ледерером [Lederer E., Glaser R. // *C.r.Acad. Sci*, v.2007, p.454-456, 1938.]. Структура и свойства этого пигмента установлены Смитом и Томсоном [Smith J., Thomson R.H. // *J.Chem. Soc.*, №3, p.1008-1012, 1961].

Известно, что нафтохиноновые пигменты являются эффективными антиоксидантами [Кольцова Е.А., Максимов О.Б., Уткина Н.К., Щедрин А.П. // *Хиноидные пигменты иглокожих* // Рукопись деп. ВИНТИ, №106, с.74, 1974].

В основе патогенеза ряда заболеваний (инфаркты, инсульты, язвенная болезнь, диабет, онкологические, воспалительные, инфекционные и др.) лежит активация перекисных и других свободно-радикальных процессов, так называемая «свободно-радикальная патология». Лекарственное корригирование подобных нарушений, т.е. антиоксидантотерапия, стало одним из ведущих направлений современных фармакологических разработок [Мищенко Н.П., Федорев С.А., Багирова В.Л. // *Хим. - фарм. журнал*, т.37, вып. 8, с.49-53, 2003; Карпов Р.С., Дудко В.А. // *Атеросклероз: патогенез, клиника, функциональная диагностика и лечение* // Томск, СТТ, с.656, 1998].

Известен и применяется в медицине природный полигидроксинафтохинон - эхинохром А, обладающий противоишемической и противоинфарктной активностью [Мищенко Н.П., Федорев С.А., Багирова В.Л. // *Хим. - фарм. журнал*, т. 37, вып. 8, с.49-53, 2003]. Аналогичную активность проявляют и другие полигидроксинафтохиноны, входящие в состав оболочных клеток панцирей и игл морских ежей, так называемые спинохромы. Антиоксидантные свойства спинохромов были изучены на моделях инициированного окисления алкибензолов, термического окисления метиленолеата и окисления минеральных и растительных масел [Кольцова Е.А., Максимов О.Б., Уткина Н.К., Щедрин А.П. // *Хиноидные пигменты иглокожих* // Рукопись деп. ВИНТИ, №106, с.74, 1974]. Константа взаимодействия спинохромов с перекисными радикалами существенно превышает константу ионола [Вопросы медицинской химии, т. 45, с.123-130, 1999] и природного антиоксиданта токоферола [Карпов Р.С., Дудко В.А. // *Атеросклероз: патогенез, клиника, функциональная диагностика и лечение* // Томск, СТТ, с.656, 1998]. Помимо этого 1,4-нафтохиноны проявляют цитотоксическую активность в отношении различных линий опухолевых клеток [Tomson R.H. // *Spinochromes. Naturally Occuring Quinones*. 1971, - 2 ed., - L. N-Y: Acad. Press., p 257-276.].

Сравнительный анализ антиоксидантной активности спинохромов показал, что антиоксидантная активность растет в зависимости от степени гидроксирования нафтохинонового цикла. Наибольшую степень гидроксирования среди этих соединений имеет спинохром Е, что, вероятно, и определяет его высокую антиоксидантную активность [Лебедев А.В., Иванова М.В. и др. // *Вопросы медицинской химии*, т. 45, с.123-130, 1999]. В то же время спинохром Е, содержащий гидроксилы во 2, 3, 5, 6, 7 и 8-м положениях, наименее устойчив в нейтральных и щелочных водных растворах. Поэтому возникла необходимость в разработке способа получения спинохрома Е, исключаящего деструкцию целевого продукта.

Известен способ получения спинохромов из морских ежей *Arbacia punetulata* путем растворения игл в концентрированной соляной кислоте, фильтрации, нейтрализации кислого раствора бикарбонатом натрия, удаления липидов эфиром, подкисления

эфирного слоя кислотой, высушивания над безводным сульфатом натрия, фильтрации, упаривания и последующей хроматографии с использованием обработанного кислотой силикагеля в системе 5% метанол-хлороформ, элюирования этилацетатом, фильтрации и упаривания досуха [Chang C.W.J., Moore J.C. // Journal of Chemical Education, v.50, p.102, 1973].

Однако известный способ является лабораторно-аналитическим. Спинохром Е был выделен в виде индивидуального вещества только методом тонкослойной хроматографии с целью его идентификации.

В качестве прототипа выбран способ получения суммы хиноидных пигментов из панцирей с иглами и внутренностей морских ежей вида *Strongylocentrotus nudus*, включающий разложение сырья кислотой, фильтрацию полученного раствора, последующую эфирную экстракцию, выделение из экстракта суммы хиноидных пигментов хроматографией на силикагеле, отмывку и сушку выделенных пигментов [Кольцова Е.А., Максимов О.Б., Уткина Н.К., Щедрин А.П. // Хиноидные пигменты иглокожих // Рукопись деп. ВИНТИ, №106, с.74, 1974].

Однако данный способ не обеспечивает получения индивидуального пигмента спинохрома Е. Он относится к лабораторно-аналитическим способам получения суммы хиноидных пигментов и непригоден для технологических целей.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в расширении спектра биологически активных веществ, получаемых из отходов промышленной переработки промысловых морских ежей. В результате осуществления изобретения получают индивидуальное соединение - спинохром Е, являющееся эффективным антиоксидантом.

Заявляемый способ получения 2,3,6,7-тетрагидроксинафтазарина (спинохрома Е) заключается в следующем.

Панцири с иглами промысловых морских ежей *Strongylocentrotus nudus*, оставшиеся после извлечения икры, свежие, дефростированные или законсервированные, промывают водой для удаления механических примесей и морских солей. При использовании консервированного сырья консервант предварительно отделяют декантацией. Содержащиеся в сырье вещества липидной природы удаляют экстракционной промывкой 96% этанолом с последующей регенерацией этанола.

Обезжиренное сырье экстрагируют трехкратно 96% этиловым спиртом с добавлением фосфорной кислоты. Соотношение сырье:экстрагент 1,0:(1,0-1,2). Экстракцию осуществляют в течение 12-24 часов при комнатной температуре. Полученный спиртовой экстракт имеет рН 3-3,5.

Суммарный пигментный комплекс очищают от посторонних примесей на хитозане. Для этого спиртовые экстракты объединяют и пропускают через хроматографическую колонку, заполненную хитозаном. Колонку с адсорбированными на хитозане пигментами промывают 96% этиловым спиртом. Пигменты элюируют с колонки 96% этиловым спиртом с добавлением соляной кислоты (рН 2-4).

Спинохром Е выделяют из пигментного комплекса на гидрофобном сорбенте полихром-1. Для этого элюат, полученный на предыдущей стадии, пропускают через хроматографическую колонку с полихромом-1. Адсорбированные компоненты отмывают от кислоты дистиллированной водой. Элюирование спинохрома Е осуществляют 40-50% этиловым спиртом. Этиловый спирт удаляют концентрированием в вакууме. Концентрат лиофилизуют.

С целью дополнительной очистки возможна кристаллизация спинохрома Е из

этанола или возгонка в вакууме при температуре 195-200°C.

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

5 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, 3.5 µm (75 мм × 4.6 мм) с защитной колонкой Hypersil ODS, 5 µm (4.0 мм × 4.0 мм). Колонку термостатировали при 30°C. Разделение примесей проводили смесью растворителей - А (вода +1% 10 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.

15 На фиг.1 представлена ВЭЖХ спиртового экстракта морских ежей *S. Nudus*.

На фиг.2 представлена ВЭЖХ кристаллосольвата спинохрома E.

На фиг.3 представлена ВЭЖХ сублимированного спинохрома E.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1

20 Панцири с иглами морских ежей *Strongylocentrotus nudus*, оставшиеся после извлечения икры, свежие или дефростированные, в количестве 100 кг промывают водой питьевой для удаления механических примесей, морских солей и измельчают.

Сырье загружают в реактор-экстрактор и экстрагируют 100 л 96% этилового спирта до полного удаления веществ липидной природы. Этиловый спирт 25 регенерируют. Обезжиренное сырье экстрагируют 117 л 96% этилового спирта с добавлением 7 л 20% фосфорной кислоты. Соотношение сырье:экстрагент 1:1. Экстракцию проводят трехкратно в течение 12 часов при комнатной температуре. Экстракты объединяют, фильтруют через тканевый фильтр и центрифугируют. 30 Полученный спиртовый экстракт имеет рН 3,0.

После этого экстракт пропускают через колонку с 5 кг измельченного хитозана. Обедненный экстракт регенерируют перегонкой и этанол возвращают в технологический процесс. Колонку с адсорбированными на хитозане пигментами промывают 10 л 96% этилового спирта. Пигменты элюируют с колонки 10 л 96% 35 этанола с добавлением 300 мл 18% соляной кислоты до рН 4,0.

Регенерация колонки - хитозан промывают 20 л 96% этилового спирта.

Элюат пропускают через колонку с 3 кг полихрома-1. При этом пигменты адсорбируются на полихроме-1. Адсорбированные пигменты отмывают от кислоты 12 40 л дистиллированной воды. Спинохром E элюируют с колонки 6 л 40% водного раствора этилового спирта. Водный остаток в количестве 2,5-3 л лиофилизируют. После сублимации в вакууме при 195-200°C получают спинохром E в виде красно-коричневого порошка.

Выход составляет 19 г (0,019% от веса исходного сырья).

45 Пример 2

Консервированное сырье - морские ежи вида *S. nudus*, в количестве 100 кг загружают в реактор, консервант сливают. Расконсервированных морских ежей экстрагируют 96% этиловым спиртом с добавлением фосфорной кислоты 50 (соотношение сырье:экстрагент 1:1,2). Экстрагент получают смешиванием 140 л этанола и 9 л 20% фосфорной кислоты. Экстракцию проводят трехкратно в течение 24 часов при комнатной температуре. Затем экстракты объединяют, фильтруют через тканевый фильтр, центрифугируют. Полученный спиртовый экстракт имеет рН 3,5.

Затем экстракт пропускают через колонку с 5 кг хитозана, упаривают и этанол возвращают в технологический процесс.

Колонку с адсорбированной суммой пигментов промывают 10 л 96% этилового спирта. Пигменты элюируют с колонки 10 л 96% этилового спирта с добавлением 340 мл 18% соляной кислоты до pH 2,0.

Регенерация колонки - хитозан промывают 20 л 96% этилового спирта.

Полученный элюат пропускают через колонку с 3 кг полихрома-1 в воде.

Адсорбированные пигменты отмывают от кислоты 12 л дистиллированной воды.

Спинохром Е элюируют с колонки 6 л 50% водного раствора этилового спирта.

Этанольный раствор упаривают досуха на роторном испарителе в вакууме. Остаток растворяют в минимальном количестве кипящего этанола, фильтруют и охлаждают.

Выпавшие кристаллы промывают охлажденным ацетоном и высушивают в вакууме.

Получают 24 г кристаллосольвата спинохрома Е (0,024% от веса исходного сырья).

Формула изобретения

Способ получения 2,3,6,7-тетрагидроксиафтазарина из морских

ежей *Strongylocentrotus nudus*, заключающийся в том, что сырье дефростируют или

отделяют от консерванта декантацией, промывают водой, обезжиривают 96%-ным

этиловым спиртом, затем экстрагируют трехкратно 96%-ным этиловым спиртом с

добавлением фосфорной кислоты (pH 3,0-3,5) при соотношении сырье : экстрагент 1,0:

(1,0-1,2) в течение 12-24 ч, полученный экстракт пропускают через колонку с

хитозаном, промывают колонку 96%-ным этиловым спиртом, затем элюируют

пигменты 96%-ным этиловым спиртом с добавлением соляной кислоты (pH 2-4), далее

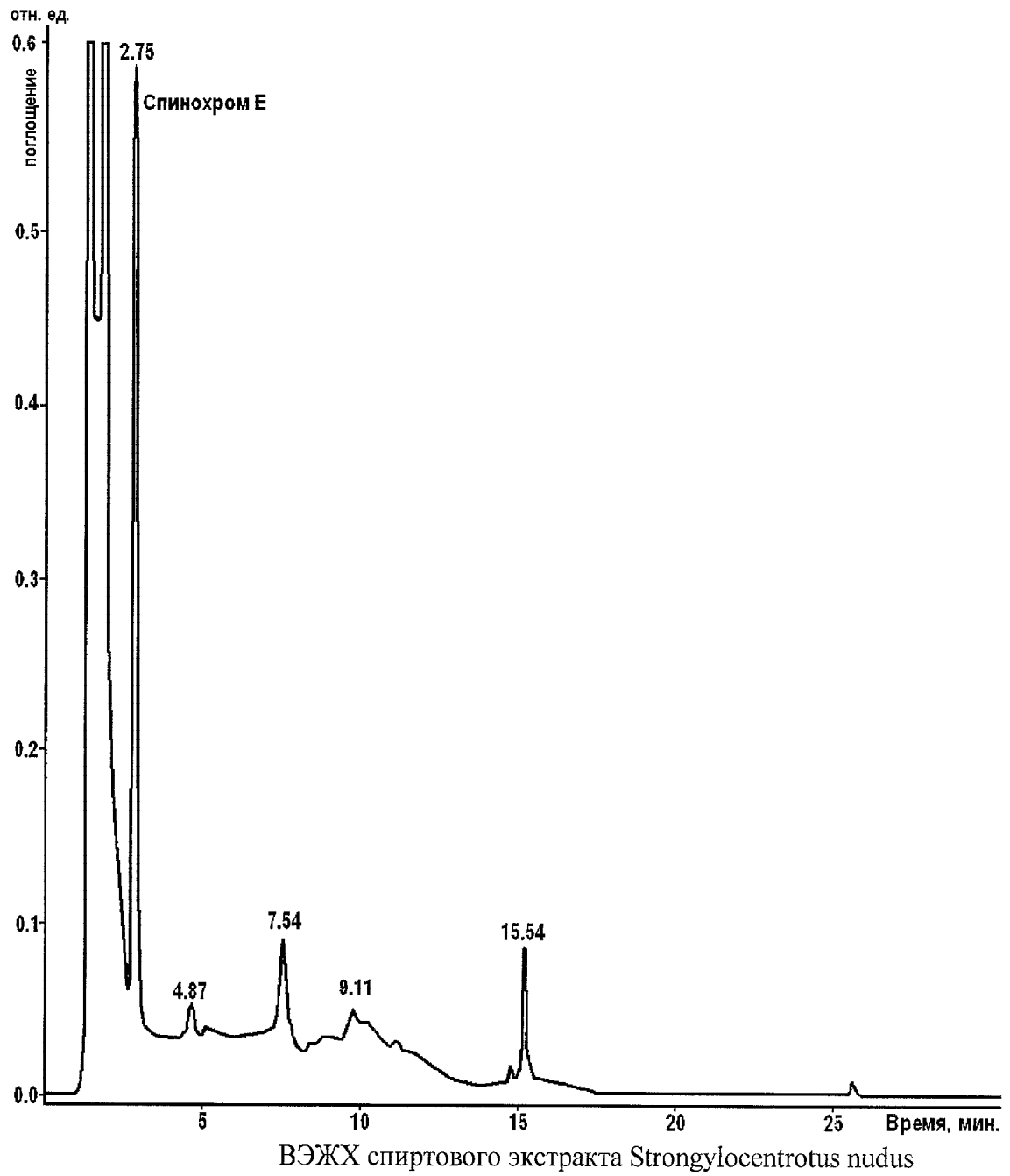
элюат пропускают через колонку с полихромом-1, промывают колонку

дистиллированной водой, затем элюируют целевой продукт 40-50%-ным водным

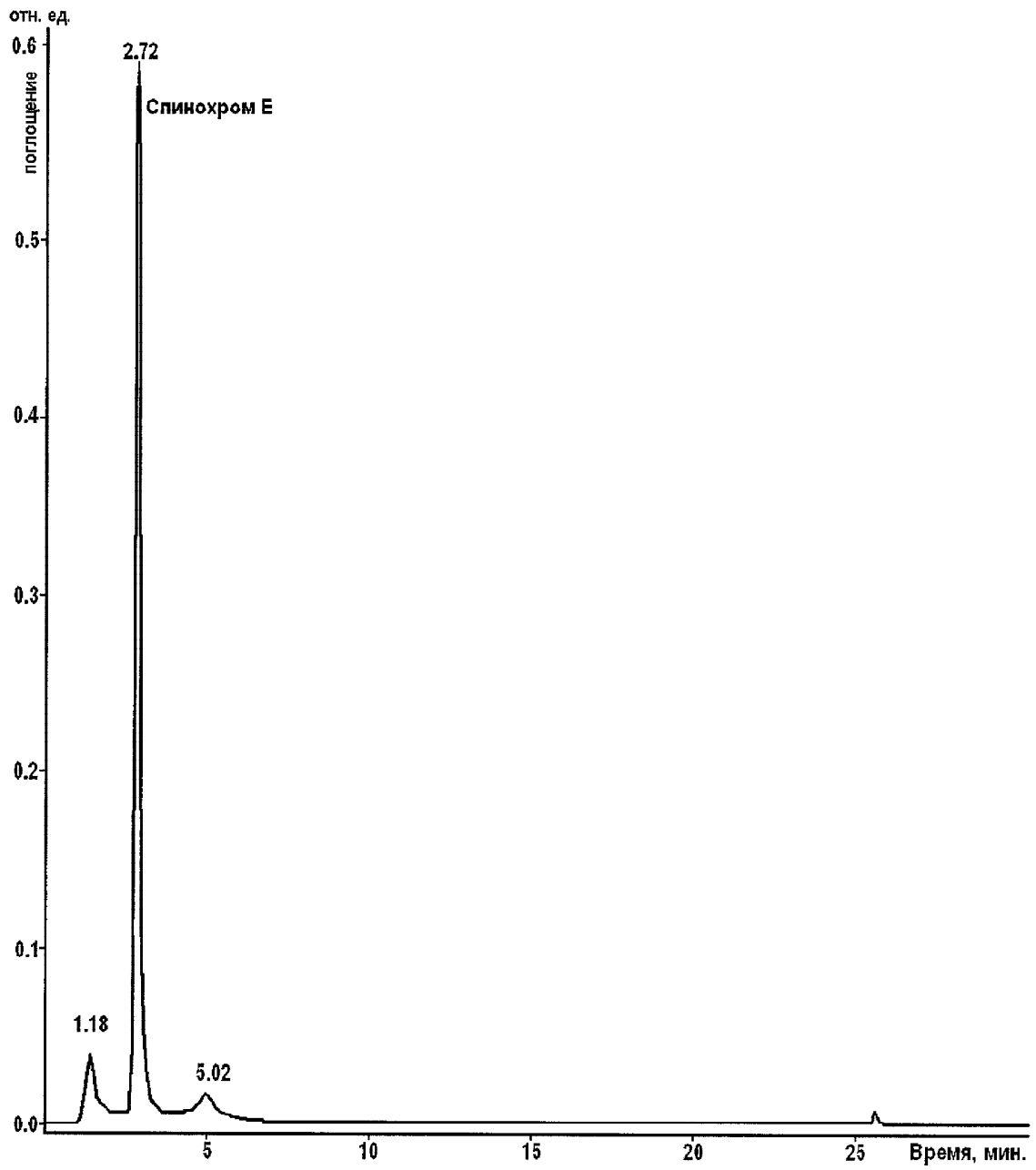
раствором этилового спирта, отгоняют растворитель в вакууме, водный остаток

лиофилизуют, затем спинохром Е сублимируют при 195-200°C или

перекристаллизовывают из этилового спирта.

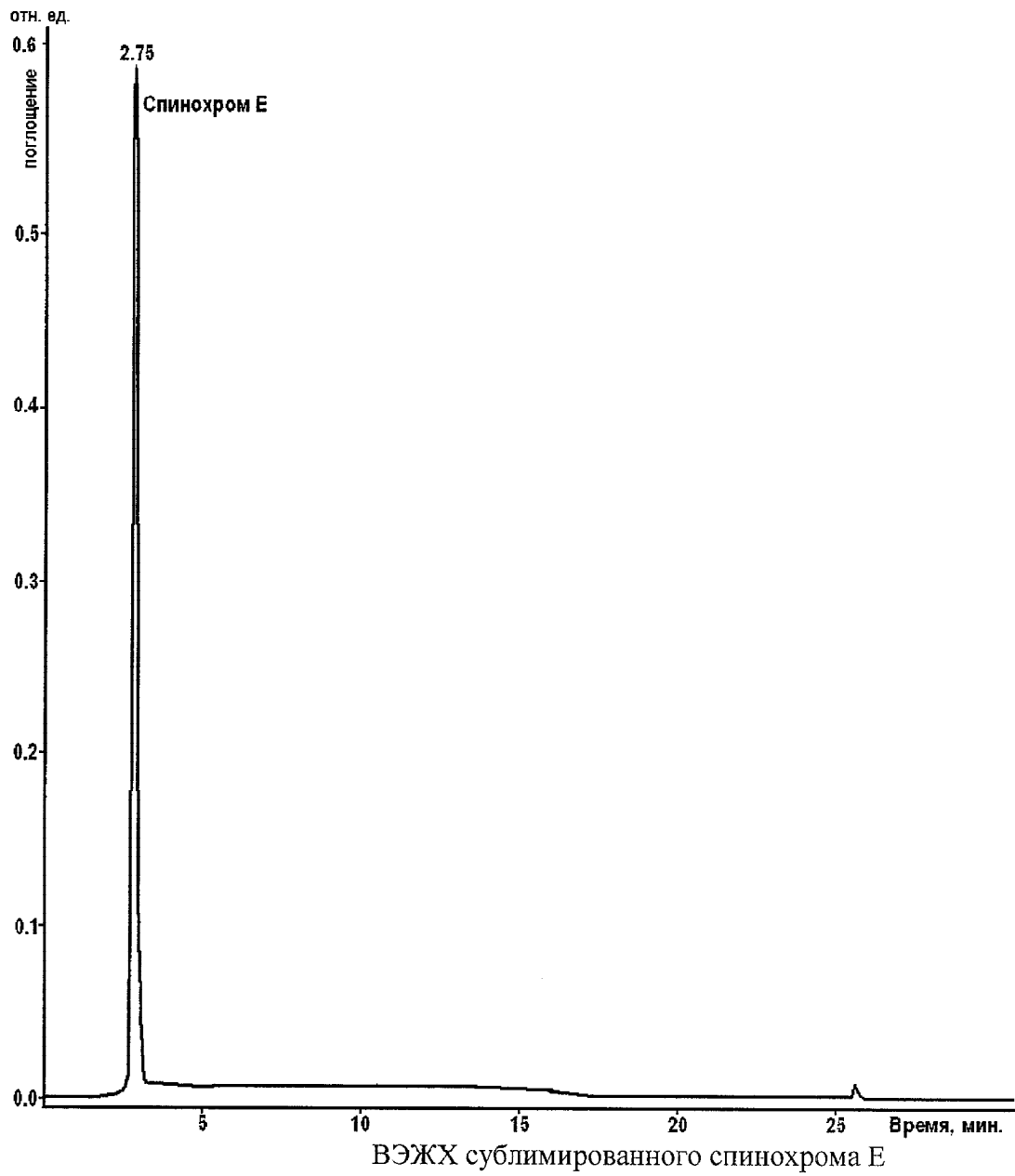


Фиг. 1



ВЭЖХ представлена ВЭЖХ кристаллосольвата спинохрома Е

Фиг. 2



Фиг. 3