



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006110267/15, 30.03.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.03.2006

(45) Опубликовано: 10.09.2007 Бюл. № 25

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: SU 1508535 A1, 27.08.1996. RU 2195296
C2, 27.12.2002. RU 2065306 C1, 20.08.1996. RU
213 7472 C1, 20.09.1999. RU 2209242 C1,
27.07.2003. SU 1113743 A1, 15.09.1984. SU
1826909 A3, 07.07.1993. WO 03035658,
01.05.2003.

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Герасименко Наталья Ивановна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ТИБОХ ДВО
РАН) (RU)

RU 2 305 548 C1

(54) СПОСОБ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ПЛОСКИХ МОРСКИХ ЕЖЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к технологии комплексной переработки плоских морских ежей с одновременным получением разных по природе биологически активных веществ, которые могут быть использованы как лекарственные препараты, а также белкового концентрата и минеральной муки, используемой в составе удобрений. Способ заключается в том, что сырье обрабатывают водным раствором органического комплексообразователя, экстракт концентрируют с получением белкового концентрата, далее к сырью добавляют водный раствор щелочи, осуществляют щелочную экстракцию, затем щелочной экстракт концентрируют с получением концентрата I, далее к сырью добавляют 75-80% спиртовой раствор органического комплексообразователя и настаивают в течение 20 часов, после чего экстракт концентрируют с получением концентрата II, далее к сырью добавляют 10% спиртовой раствор 30% серной кислоты, настаивают, экстракт концентрируют с получением концентрата III; далее к сырью снова добавляют раствор серной кислоты, настаивают и концентрируют, получают концентрат IV; вновь добавляют раствор разбавленной серной кислоты, настаивают, экстракт концентрируют с получением концентрата V; далее очищают I-й, II-

й, III-й концентраты в отдельности, при этом для очищения к каждому концентрату добавляют равный объем гексана, смесь перемешивают и оставляют до разделения фаз; для I и II концентратов процедуру повторяют трижды, отделяют нижнюю водно-спиртовую фазу, ее концентрируют досуха и добавляют холодный ацетон, смесь интенсивно взбалтывают и получают ацетоновый экстракт с остатком, нерастворимым в ацетоне, процедуру очистки ацетоном повторяют еще дважды, после удаления ацетона остаток со смесью ганглиозидов сохраняют в этиловом спирте при -4°C; эхинохром А получают из III-го концентрата, для этого к концентрату добавляют равный объем гексана, смесь перемешивают и оставляют до разделения фаз, отбирают нижнюю водно-спиртовую фазу, которую дважды очищают гексаном, далее извлекают хлороформную фракцию с эхинохромом А при объемном соотношении водно-спиртовая фаза : хлороформ 1: 2; процедуру повторяют трижды, объединяют полученные хлороформные экстракты и концентрируют, далее очищают от примесей водным раствором соли двухвалентного металла при соотношении хлороформного экстракта 2:1 и концентрируют досуха. Изобретение обеспечивает расширение спектра биологически активных

RU 2 305 548 C1

R U 2 3 0 5 5 4 8 C 1

R U 2 3 0 5 5 4 8 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006110267/15, 30.03.2006**(24) Effective date for property rights: **30.03.2006**(45) Date of publication: **10.09.2007 Bull. 25**

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

Gerasimenko Natal'ja Ivanovna (RU)

(73) Proprietor(s):

**TIKHOKEANSKIJ INSTITUT
BIOORGANICHESKOJ KHMII
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJa
ROSSIJSKOJ AKADEMII NAUK (TIBOKh DVO
RAN) (RU)**

(54) **METHOD FOR COMPLEX REPROCESSING OF CAKE URCHINS**

(57) Abstract:

FIELD: production of biologically active substances.

SUBSTANCE: claimed method includes raw material treatment with aqueous solution of organic complexing agent; extract concentration to produce protein concentrate. Then alkali aqueous solution is added to raw materials; alkali extraction is carried out; alkali extract is concentrated to produce concentrate I. Further 75-80 alcohol solution of organic complexing agent is added to raw materials and mixture is infused for 20 hours. Extract is concentrated to produce concentrate II. Further 10 % alcohol solution of 30 % sulfuric acid is added to raw materials, mixture is infused and concentrated to produce concentrate III. Then sulfuric acid is added solution is added to raw materials again, mixture is infused and concentrated to produce concentrate IV. Diluted sulfuric acid solution is added again, mixture is infused and concentrated to produce concentrate V. Concentrates I, II, III are separately purified wherein equal hexane volume is added to each concentrate, mixture is agitated and conditioned up to phase separation.

For concentrates I and II such procedure is repeated three times. Bottom aqueous-alcohol phase is separated, concentrated up to dry state and cold acetone is added. Mixture is intensively shaken to produce acetone extract with insoluble in acetone deposit. Such procedure is doubly repeated and after acetone removing rest with ganglioside mixture is stored in ethanol at -4°. Equinochrome A is obtained from concentrate III by addition of equal hexane volume, mixture agitating and conditioning up to phase separation. Bottom aqueous-alcohol phase is separated, twice purified with hexane. Further chloroform fraction with equinochrome A is recovered in aqueous-alcohol phase/chloroform ratio of 1:2. Such procedure is repeated three times. Obtained chloroform concentrates are combined, concentrated, purified from impurities with bivalent metal salt aqueous solution in chloroform extract ratio of 2:1, and concentrated up to dry state.

EFFECT: enhanced spectrum of biologically active substances.

2 cl, 4 ex

Изобретение относится к технологии комплексной переработки плоских морских ежей с одновременным получением разных по природе биологически активных веществ: ганглиозидов, относящихся к гликофинголипидам, и эхинохрома А, относящегося к хиноидным пигментам, а также белкового концентрата и минеральной муки.

5 Актуальность задачи получения ганглиозидов и эхинохрома А обусловлена следующими причинами.

Ганглиозиды (гликофинголипиды, содержащие сиаловую кислоту) последние два десятилетия вызывают огромный интерес в связи с возможностью использования их и в качестве терапевтических средств и в качестве терапевтических мишеней при симптомах
10 рака, патологий периферической и центральной нервной системы, вирусной и бактериальной инфекций и иммуносупрессии. Описаны примеры их применения для защиты от аллергии взрослых людей, недоношенных, грудных детей и детей младшего
15 возраста. Ганглиозиды (или их соли или эфиры) применяют в составе фармацевтических композиций для лечения глазных невритов, атрофии зрительного нерва, генитального герпеса и других вирусных инфекций (таких как СПИД). Предклинические и клинические
испытания показали целесообразность использования поливалентных фармацевтических композиций с применением разных видов ганглиозидов. Дефицит же ганглиозидов в
качестве терапевтических средств ограничивает возможности испытания их в клинике для
различных терапевтических вмешательств.

20 Эхинохром А (2,3,5,7,8-пентагидроокси-6-этил-1,4-нафтохинон) является действующим началом кардиопротекторного и офтальмологического препаратов гистохром [RU 2137472 C1, 10.08.99, RU 2134107 C1, 20.09.99].

Обычно в лабораторных масштабах для выделения ганглиозидов с целью определения их структуры, физико-химических свойств и исследования распределения ганглиозидов в
25 различных типах живых организмов, их органах и тканях используют методы, состоящие в общем виде из экстракции суммы липидов из тканей хлороформ-метанольными или хлороформ-метанол-водными смесями, разделении липидов по полярности между водно-метальной и хлороформной фазами с переходом ганглиозидов в верхнюю обогащенную
30 водой фазу и дальнейшей очисткой ганглиозидов или разделением их на классы ионообменной колоночной хроматографией. Иногда при получении фракций, содержащих ганглиозиды и фосфолипиды, последние удаляют мягкой щелочной обработкой, после чего образовавшуюся смесь диализуют, а чистые ганглиозиды далее выделяют колоночной хроматографией на силикагеле.

В промышленных масштабах традиционно для выделения ганглиозидов используют
35 головной мозг позвоночных, богатый этим классом липидов, реже спинной мозг или молоко млекопитающих.

Известен способ получения ганглиозидов из мозга быка, включающий обработку ацетоном тканей, содержащих ганглиозиды, с получением ацетонового преципитата, который суспендируют в смеси метилхлорида, метанола и щелочи для отделения
40 гидрофобных веществ от гидрофильных [РТ 97694, 30.11.1992]. После отделения жидкой фазы фильтрацией из нее выделяют первые сырые ганглиозиды ацетоном и хлористым кальцием. Далее проводят ряд процедур для их очистки, которые включают растворение в смеси хлороформ-метанол-вода с нагреванием и последующим добавлением н-бутанола для отделения гидрофобных веществ от гидрофильных и извлечением из водной фазы
45 вторых сырых ганглиозидов добавлением ацетона и хлорида натрия. Вторые сырые ганглиозиды далее растворяют в метаноле, охлаждают для получения третьих сырых ганглиозидов, которые растворяют в водном растворе щелочи и после выдерживания в течение 1 часа нейтрализуют и диализуют через мембрану 10 kD с получением ганглиозидной смеси, которую высушивают, перерастворяют в буфере и стерилизуют для
50 освобождения от чужеродных вирусов.

Однако известный способ выделения ганглиозидов достаточно сложен и трудоемок, включает использование метанола, вещества ядовитого в рамках промышленного производства. Процедуры очистки сырых ганглиозидов путем многочисленных

пересажений неизбежно приводят к потере целевых продуктов.

Известен способ получения ганглиозидов из мозга, предусматривающий гомогенизацию и обезвоживание серого вещества головного мозга ацетоном, экстрагирование обезвоженного серого вещества смесью хлороформа с этанолом, отделение супернатанта центрифугированием с последующим выделением из него целевого продукта охлажденным ацетоном, при этом образующийся супернатант также очищают ацетоном, супернатанты фильтруют и осадки, представляющие собой смесь ганглиозидов, окончательно освобождают от супернатанта центрифугированием млекопитающих [RU 2195296 C2, 27.12.2002].

Недостатком этого способа является использование значительного количества пожароопасного ацетона.

Известен способ выделения гликолипидов (в том числе и ганглиозидов) из большого числа биологических источников, включающий экстракцию веществ смесью неполярного и полярного растворителей, последующий гидролиз экстрактов и выделение из гидролизованных экстрактов целевых продуктов с использованием полупроницаемой мембраны и раствора с низким осмотическим давлением [WO 03035658, 01.05.2003].

Однако способ позволяет получить смесь, которая содержит помимо ганглиозидов цереброзиды и сульфатиды.

Известен способ получения эхинохрома А (2,3,5,7,8-пентагидроокси-6-этил-1,4-нафтохинона) из плоских морских ежей, включающий экстракцию морских ежей разбавленными растворами серной кислоты в этиловом спирте с последующей жидкостной экстракцией хлороформом в смеси с водой при комнатной температуре и объемном соотношении хлороформ : вода 1:1, и последующей перекристаллизацией целевого продукта из смеси диоксан-гексан = 5:1 [SU 1508535 A1, 27.08.1996].

Недостатком этого способа является использование ценного биологического сырья для получения одного продукта - эхинохрома А, липидная же фракция составляет примесь, для удаления которой вводится процедура перекристаллизации из смеси диоксан-гексан.

Способов комплексной переработки плоских морских ежей с получением нескольких биологически активных веществ в доступной патентной и другой научно-технической литературе не обнаружено.

Задача изобретения - разработка способа комплексной переработки плоских морских ежей с получением суммарных ганглиозидов, фракции, обогащенной эхинохромом А, а также белкового концентрата и минеральной муки.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в расширении спектра биологически активных веществ, получаемых из плоских морских ежей.

Заявляемый способ обеспечивает получение из этого сырьевого источника помимо эхинохрома А других отличающихся от него по природе ценных биологически активных веществ, а именно суммарных ганглиозидов. Кроме того, в процессе переработки плоских морских ежей получают белковый концентрат, который можно использовать в качестве кормовой добавки, а из панциря - минеральную муку, которую рекомендуется использовать в составе минеральных удобрений.

Технический результат заключается также в том, что предварительное удаление из сырья нейтральных липидов и фосфолипидов за счет мягкого щелочного гидролиза упрощает процедуру получения ганглиозидов и далее эхинохрома, а последующее удаление гексаном холестерина и части образовавшихся свободных жирных кислот из концентратов эхинохрома облегчает дальнейшую его перекристаллизацию.

Поставленная задача решена следующим образом: после загрузки морских ежей (свежевыловленных или замороженных) в реактор экстракцию производят последовательно водным раствором, содержащим органический комплексообразователь, водным раствором щелочи (температура раствора 38-45°C, время экстракции 3-4 час), спиртовым раствором, содержащим органический комплексообразователь, трижды спиртовыми растворами разбавленной серной кислоты. Далее проводят извлечение целевых продуктов из сконцентрированных экстрактов и их очистку. Для ганглиозидов -

это извлечение их гексаном из щелочного концентрата и концентрата спиртового раствора, содержащего органический комплексообразователь, с последующим концентрированием гексановых экстрактов досуха, добавлением к сухому остатку холодного ацетона, отделением не растворившегося в ацетоне осадка и дополнительной
5 очисткой его холодным ацетоном. Извлечение эхинохрома А проводят хлороформом из концентратов спиртовых растворов разбавленной серной кислоты, предварительно очищенных гексаном, с последующей очисткой хлороформного экстракта водным раствором соли двухвалентного металла.

Таким образом, в заявляемом способе комплексной переработки плоских морских ежей
10 перед извлечением целевых продуктов проводится частичное удаление нелипидных примесей и растворимых в воде пигментов из морских ежей водным раствором, содержащим органический комплексообразователь, удаление липидов (нейтральных и фосфолипидов) - горячим (38-45°C) раствором щелочи за счет их омыления и последующей экстракции продуктов гидролиза спиртовым раствором, содержащим
15 органический комплексообразователь. Перед извлечением эхинохрома А хлороформом проводится удаление гексаном холестерина и свободных жирных кислот из концентратов спиртовых растворов разбавленной серной кислоты с последующей дополнительной очисткой эхинохрома А, извлеченного хлороформом, от свободных жирных кислот и сопутствующих пигментов водным раствором соли двухвалентного металла.
20 Дополнительные процедуры облегчают последующую кристаллизацию эхинохрома.

Осуществление изобретения иллюстрируется следующими сравнительными примерами.

Пример 1. 15 кг плоских морских ежей экстрагируют настаиванием в течение 19 часов в 15,5 л (с образованием «зеркала» над поверхностью сырья) смеси питьевой воды с органическим комплексообразователем (из расчета 1 г комплексообразователя на 1 литр
25 воды). Экстракт 1 (белковый) удаляют из реактора и отправляют на концентрирование, а к морским ежам добавляют 15,5 л 2,5% водного раствора щелочи с температурой раствора 41°C и выдерживают в течение 3,5 часов для омыления нейтральных липидов и фосфолипидов. Щелочной экстракт удаляют из реактора и концентрируют до 1 л (концентрат I). К морским ежам в реакторе добавляют 15,5 л 0,2% спиртового (75-80%
30 спирт) раствора органического комплексообразователя и настаивают около 20 часов, после чего экстракт удаляют из реактора и концентрируют до 500 мл (концентрат II).

К морским ежам в реакторе добавляют 15,5 л 10% спиртового раствора разбавленной (30%) серной кислоты (экстрагент I) и настаивают в течение 5 часов. Экстракт удаляют из реактора и концентрируют до 500 мл (концентрат III).

35 К морским ежам в реакторе снова добавляют 15,5 л свежего экстрагента I и настаивают около 18 часов. Экстракт удаляют из реактора и концентрируют до 500 мл (концентрат IV).

К морским ежам в реакторе вновь добавляют 15,5 л свежего экстрагента I и настаивают в течение 3 часов. Экстракт удаляют из реактора и концентрируют до 200. мл (концентрат V).

40 Остаток морских ежей в реакторе промывают 5-7 объемами водопроводной воды для удаления остаточного спирта и понижения pH раствора до 6,0-6,5 и отправляют на сушку и измельчение. Выход минеральной муки составляет порядка 10,5 кг.

Экстракт 1 (белковая кормовая добавка) после концентрирования представляет собой плотную массу, содержащую 70-71% белка, 0,5% липидов, 0,9% пигментов, до 7,3%
45 минеральных веществ, 12-15% влаги. Выход продукта составляет порядка 2,8% (420 г) от веса исходного сырья.

Очистка концентрата I. К 1 л концентрата I добавляют равный объем гексана, смесь перемешивают и оставляют до расслоения на 2 фазы. Процедуру повторяют трижды.

Гексановые фазы после отделения объединяют и концентрируют досуха. К сухому
50 остатку добавляют холодный ацетон. Смесь интенсивно взбалтывают и получают ярко-желтый ацетоновый экстракт, содержащий холестерин, свободные жирные кислоты, вещества каротиноидной природы и остаток, нерастворимый в ацетоне. Процедуру очистки ацетоном нерастворимого остатка повторяют еще дважды. После удаления ацетона

остаток, представляющий собой смесь ганглиозидов, сохраняют в этиловом спирте при -4°C. Выход ганглиозидов на стадии составляет 1,8 г.

Очистка концентрата II. К 500 мл концентрата II добавляют равный объем гексана. После перемешивания смеси и ее расслаивания отделяют нижнюю водно-спиртовую фазу, которую концентрируют досуха и очищают ацетоном, как и в случае концентрата I. Выход ганглиозидов на стадии составляет 0,33 г.

Суммарный выход ганглиозидов - 2,13 г. Чистота продукта порядка 97%.

Очистка концентрата III. К 500 мл концентрата III добавляют равный объем гексана, смесь перемешивают и оставляют до разделения фаз. Отбирают нижнюю водно-спиртовую фазу, которую еще дважды очищают гексаном. Из очищенной гексаном водно-спиртовой фазы извлекают хлороформом (в соотношении водно-спиртовая фаза : хлороформ 1:2, объемные соотношения) фракцию, содержащую эхинохром. Процедуру извлечения эхинохрома повторяют трижды. Объединенные хлороформные экстракты концентрируют до 500 мл и очищают от примесей сопутствующих пигментов и свободных жирных кислот водным раствором соли двухвалентного металла (соотношение хлороформный экстракт : водный раствор 2:1, объемные соотношения). Очищенный эхинохром концентрируют досуха. Чистота продукта - 78%. Примеси - холестерин, свободные жирные кислоты, сопутствующие пигменты. Выход фракции - 9,3 г (80% от содержания эхинохрома А в сырье).

Пример 2. Выполняют аналогично примеру 1 за исключением того, что не проводят предварительное извлечение не липидных примесей водным раствором органического комплексообразователя. Выполнение этой процедуры в примере 1 позволяет удалить из 15 кг сырья дополнительно порядка 420 г примесей (преимущественно белки, незначительные количества фосфолипидов и нейтральных липидов, пигменты, неорганические примеси), что облегчает последующую очистку ганглиозидов от них в примере 1. Чистота фракции ганглиозидов в примере 2 ниже и составляет 92% при выходе 2,3 г.

Процедура выделения эхинохрома А аналогична тому, как описано в примере 1. Пример 3. Выполняют аналогично примеру 1, но гидролиз липидов ведут при комнатной температуре в течение суток. В этом случае нейтральные липиды и фосфолипиды из-за их неполного гидролиза составляют примеси как во фракции суммарных ганглиозидов, так и во фракции эхинохрома А. Чистота целевых продуктов составляет 72 и 70% соответственно.

Пример 4. Выполняют аналогично примеру 1, но извлечение целевых продуктов ведут хлороформом без применения гексана, что приводит к получению целевых продуктов с более низкой чистотой, порядка 48% для ганглиозидов и 32% для фракции, содержащей эхинохром А.

Формула изобретения

1. Способ комплексной переработки плоских морских ежей, заключающийся в том, что сырье обрабатывают водным раствором органического комплексообразователя, экстракт концентрируют с получением белкового концентрата, далее к сырью добавляют водный раствор щелочи, осуществляют щелочную экстракцию при температуре 38-45°C в течение 3-4 ч, затем щелочной экстракт концентрируют с получением концентрата I, далее к сырью добавляют 75-80%-ный спиртовой раствор органического комплексообразователя и настаивают в течение 20 ч, после чего экстракт концентрируют с получением концентрата II, далее к сырью добавляют 10%-ный спиртовой раствор 30%-ной серной кислоты, настаивают 5 ч, экстракт концентрируют с получением концентрата III; далее к сырью снова добавляют раствор серной кислоты, настаивают 18 ч и концентрируют, получают концентрат IV; вновь добавляют раствор разбавленной серной кислоты, настаивают 3 ч, экстракт концентрируют с получением концентрата V; далее очищают I-й, II-й, III-й концентраты в отдельности, при этом для очищения к каждому концентрату добавляют равный объем гексана, смесь перемешивают и оставляют до разделения фаз; для I и II концентратов процедуру повторяют трижды, отделяют нижнюю водно-спиртовую фазу, ее

концентрируют досуха и добавляют холодный ацетон, смесь интенсивно взбалтывают и получают ацетоновый экстракт с остатком, нерастворимым в ацетоне, процедуру очистки ацетоном повторяют еще дважды, после удаления ацетона остаток со смесью ганглиозидов сохраняют в этиловом спирте при -4°C ; эхинохром А получают из III-го концентрата, для

5 этого к концентрату добавляют равный объем гексана, смесь перемешивают и оставляют до разделения фаз, отбирают нижнюю водно-спиртовую фазу, которую дважды очищают гексаном, далее извлекают хлороформную фракцию с эхинохромом А при объемном соотношении водно-спиртовая фаза : хлороформ 1:2; процедуру повторяют трижды, объединяют полученные хлороформные экстракты и концентрируют, далее очищают от
10 примесей водным раствором соли двухвалентного металла при соотношении хлороформного экстракта 2:1 и концентрируют досуха.

2. Способ по п.1, в котором остатки плоских морских ежей сушат и измельчают до получения минеральной муки.

15

20

25

30

35

40

45

50