



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008151492/13, 23.12.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.12.2008

(45) Опубликовано: 10.08.2010 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 2005/0049284 A1, 2005.02.03. US
5650439, 22.07.1997. US 6951870, 04.10.2005.

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),
Маханьков Вячеслав Валентинович (RU),
Купера Елена Владимировна (RU),
Ружцова Татьяна Анатольевна (RU),
Козловская Эмма Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПУРПУРОГАЛЛИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармакологическому производству и может быть использовано для получения пурпуругаллина. Способ предусматривает ферментативное окисление пирогаллола в присутствии перекиси водорода и последующую хроматографическую очистку целевого продукта. В качестве источника фермента и перекиси водорода используют морских ежей *Scaphechinus mirabilis*,

находящихся в биореакторе с морской водой. В биореактор добавляют водный раствор пирогаллола до его концентрации в морской воде 0,4-0,6 мг/мл. Хроматографическую очистку осуществляют на полихrome-1 с последующим элюированием целевого продукта с сорбента 40-60% водным раствором этилового спирта, упариванием в вакууме и кристаллизацией из водного раствора спирта. Изобретение позволяет увеличить выход пурпуругаллина. 3 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21), (22) Application: **2008151492/13, 23.12.2008**(24) Effective date for property rights:
23.12.2008(45) Date of publication: **10.08.2010 Bull. 22**

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

(73) Proprietor(s):

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

(54) METHOD FOR MAKING PURPUROGALLIN

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: invention refers to pharmacological production and can be used for making purpurogallin. The method provides enzymic oxidation of pyrogallol with hydrogen peroxide added and following chromatographic purification of an end product. Scaphechinus mirabilis urchins placed in a bioreactor with sea water are used as a source of enzyme and hydrogen peroxide. Aqueous pyrogallol

is added to the bioreactor to sea water concentration 0.4-0.6 mg/ml. Chromatographic purification is enabled on polychrome-1 with following elution of the end product from a sorbent with 40-60 % aqueous ethanol, vacuum stripping and crystallisation from aqueous ethanol.

EFFECT: invention allows for higher yield of purpurogallin.

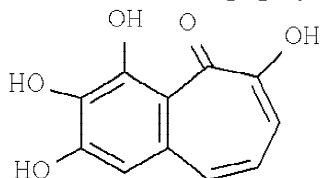
1 ex, 3 dwg

Изобретение относится к фармакологическому производству и может быть использовано для получения биологически активных веществ из гидробионтов.

Плоский морской еж *Scaphechinus mirabilis* является источником получения эхинохрома А - субстанции кардиологического и офтальмологического препаратов «Гистохром», биологически активных добавок «Тимарин», «Золотой Рог» и других. В то же время это ценное природное сырье может служить источником и продуцентом других биологически активных веществ, в частности пурпуругаллина.

Природный антиоксидант - пурпуругаллин представляет собой индивидуальное соединение 2,7,8,9-тетрагидроксибензо[*f*]трополон.

Химическая формула пурпуругаллина:



Молекулярный вес 220,18.

Исследования показали, что пурпуругаллин является эффективным стабилизатором масел от окисления [US 4181545, 01.01.1980], может являться эффективным цитопротектором для клеток печени [Wu T.W. et al. *Biochem. Cell Biol.* 1991. V.69. No 10-11. P.747-759], почек [Zeng L.H. et al. // *Biochem. Cell Biol.* 1992. V.70. No. 8. P.684-690], кардиоцитов [Wu T.W. et al. // *Biochem. Cell Biol.* 1992. V.70. No. 9. P.803-809]. Он также предохраняет эритроциты человека от лизиса пероксил-радикалом [Wu T.W. et al. // *Life Sci.* 1994. V.54(2). P.PL23-PL28]. Пурпуругаллин способен ингибировать синтез ДНК некоторых опухолевых клеток [Sugiyama H., Fung K.P., Wu T.W. // *Life Sci.* 1993. V.53. No 4. P.39-43], показал антибактериальную активность против грамположительных бактерий, включая *Staphylococcus aureus* [Sheu S.Y. et al. // *Anticancer Res.* 1998. V.8(1 A). P.263-267]. Пурпуругаллин защищает желудочковые миоциты и эндотелиальные клетки аорты и гепатоциты от гидроксильных радикалов [Wu T.W. et al. // *Biochem. Cell Biol.* 1992. V.70. No. 9. P.803-809]. Он также является перспективным профилактическим противораковым средством [Fung K.P. et al. // *Chemother.* 1996. V.42. P.199-205].

Селективность пурпуругаллина как антиоксиданта обусловлена тем, что он является ловушкой для супероксид анионов пероксида водорода или гидроксил радикалов. Эффективность пурпуругаллина и его гликозидов намного выше, чем эффективность антиоксидантов Тролокс и аскорбиновой кислоты. Он нормализует состав крови больных с ишемической болезнью сердца. Пурпуругаллин не токсичен и устойчив в кровотоке в нативном состоянии в течение нескольких недель. На его основе могут быть созданы лекарственные препараты для лечения заболеваний, вызванных оксидативным стрессом.

Известен способ получения пурпуругаллина из галлов (чернильных орешков) дуба - разрастаний на молодых ветках дубов, инвазированных личинками перепончатокрылых насекомых [Nierenstein M., Swanton A. // *Biochem. J.*, 1944, V.38. P.373-375]. Сущность способа состоит в экстракции высушенного при 100°C и измельченного материала последовательно хлороформом, четыреххлористым углеродом и этанолом, упаривании экстракта, последующем экстрагировании остатка, смешанного с серебряным порошком в соотношении 1:10 по весу в Сокслете с кипящей водой, выпаривании полученного экстракта до трети объема, кристаллизации из воды и гидролиза серной кислотой или энзимного гидролиза с

пурпурогаллазой.

Недостатками данного способа являются:

- использование в качестве катализатора драгоценного металла (порошкового серебра), что значительно удорожает процесс;

- ограниченность сырьевой базы и, как следствие, непригодность способа для промышленного использования.

Известен способ получения пурпурогаллина путем окисления пирогаллола нитритом натрия и уксусной кислотой, либо иодатом натрия и последующей кристаллизацией целевого продукта из ледяной уксусной кислоты [Barltrop J.A., Nicholson J.S. // J. Chem. Soc. 1948. P.116-120]. Выход целевого продукта - 72%. Способ непригоден для промышленного использования, т.к. предусматривает использование взрывоопасных ингредиентов в процессе синтеза.

Известен способ получения производных пурпурогаллина в биохимическом реакторе с использованием биологически чистой культуры микроорганизмов рода *Absidia carable* [US 5650439, 22.07.1997]. Сущность способа состоит в инакуляции исходной культуры в питательную среду при pH 7 в течение 9 дней. Полученный бульон экстрагируют бутанолом при pH 2. Бутанольный экстракт концентрируют и последовательно хроматографируют на Dianon HP-21 в системе вода-ацетон, сефадексе LH-20 в метаноле, Bond elute C₁₈ в системе вода-метанол. Концентрат экстрагируют этилацетатом при pH 2 и очищают на Carcellrae C₁₈ в системе метанол-вода-NaH₂PO₄ при pH 2,2. Из 10 л бульона получается 14 мг коричневого аморфного порошка 8-О-пурпурогаллинкарбоксихлориды.

Недостатками данного способа являются:

- получение в качестве конечного продукта производного пирогаллола в виде кислоты;

- длительность процесса очистки (4-х стадийная препаративная колоночная хроматография);

- длительность процесса получения исходного экстракта (9 суток);

- использование токсичных реактивов (метанол, н-бутанол);

необходимость соблюдения стерильности процесса (микробиологическое производство).

Наиболее близким к заявляемому способу является способ получения пурпурогаллина путем ферментативного окислительного синтеза из пирогаллола и катехола. Способ включает растворение 1,0 г пирогаллола и 1,0 г катехола в смеси ацетон - фосфатно-цитратный буфер pH 5,0 (1:10 по объему, 50 мл) с добавлением 2 мг пероксидазы хрена и последовательным добавлением четырехкратно в течение часа при перемешивании 2 мл 3,13% перекиси водорода. Пирогаллол экстрагируют из реакционной смеси этилацетатом (3 раза по 50 мл), концентрируют и хроматографируют на Сефадексе LH-20 с последующим элюированием водно-ацетоновой смесью (40%). После упаривания элюата получают 300 мг пурпурогаллина. Выход целевого продукта - 12% [US 2005/0049284 A1, 2005.02.03].

Недостатками известного способа являются:

- низкий выход целевого продукта (12%);

- использование пожароопасных реактивов (этилацетат, ацетон).

Задачей изобретения является разработка способа получения пурпурогаллина из гидробионтов.

Поставленная задача решена способом получения пурпурогаллина путем ферментативного окисления пирогаллола в присутствии перекиси водорода с

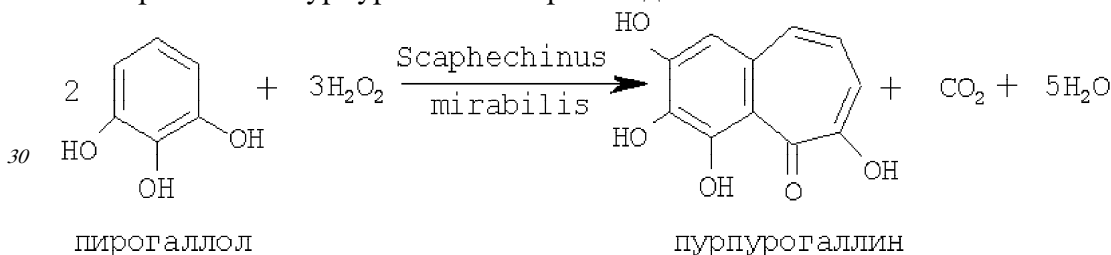
последующей хроматографической очисткой целевого продукта, в котором согласно изобретению в качестве источника фермента и перекиси водорода используют морских ежей *Scaphechinus mirabilis*, находящихся в биореакторе с морской водой при температуре 18-22°C, в который добавляют водный раствор пирогаллола до конечной его концентрации в морской воде 0,4-0,5 мг/мл, хроматографическую очистку осуществляют на полихrome-1 с последующим элюированием целевого продукта с сорбента 40-60% водным раствором этилового спирта, упариванием в вакууме и кристаллизацией из водного раствора этилового спирта. Выход пурпуругаллина составляет 75% от веса исходного сырья.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в увеличении выхода пурпуругаллина в 6 раз по сравнению с его выходом по способу-прототипу. Способ позволяет рационально использовать ценное биологическое сырье - морских ежей, которые являются сырьем для производства эхинохрома А - субстанции лекарственных препаратов серии «Гистохром».

Предлагаемый способ получения пурпуругаллина существенно отличается от аналогов и прототипа, т.к. основан на применении варианта биореактора с живыми макроорганизмами (морские ежи), в котором происходит биосинтез пурпуругаллина из пирогаллола с использованием ферментных систем морских ежей *S. Mirabilis* и пероксида водорода.

Биореактор представляет собой проточный аквариум, в который помещают морских ежей. В морскую воду вводят искусственно пирогаллол, и морские ежи начинают превращать его в пурпуругаллин.

Образование пурпуругаллина происходит по схеме



Источником пероксида водорода служат симбиотные с морскими ежами микроорганизмы и диатомовые водоросли, являющиеся основным объектом питания ежей *S. mirabilis*. Эти микроводоросли синтезируют H_2O_2 за счет собственного фотосинтезирующего аппарата. Помимо этого, в состав оболочных панцирей и игл морских ежей входят полигидроксинафтохиноны, в частности эхинохром А.

Полигидроксинафтохиноны находятся внутри клеток морских ежей, покрывающих или входящих в состав биоминерального матрикса ежей. В комплексе с клеточными ферментами (флавиновыми белками) они участвуют в процессе образования пероксида водорода, который при наличии в организме ежей фермента каталазы и других пероксидаз, превращается в кислород и воду, обеспечивая кислородное питание всех внутренних органов и тканей морских ежей.

На фиг.1 представлена принципиальная схема биореактора.

Морских ежей помещают на дно аквариума (1) и заливают морской водой (слой воды должен быть выше поверхности ежей на 2 см). Из емкости (2) дозированно прибавляют раствор пирогаллола до конечной концентрации его в морской воде 0,4-0,6 мг/мл. Включают насос, циркулирующий воду через фильтр-ловушку (3) с полихромом-1. Биореактор функционирует в течение 24 часов. При заполнении фильтра-ловушки пурпуругаллином на две трети фильтр-ловушку выводят из системы и заменяют новым. Степень заполнения определяют визуально: пурпуругаллин имеет

темно-коричневый цвет. Фильтр-ловушку промывают дистиллированной или деминерализованной водой, затем 10% водным раствором этилового спирта. Целевой продукт элюируют с сорбента 40-60% водным раствором этилового спирта. Раствор пурпуругаллина упаривают в вакууме, а затем кристаллизуют целевой продукт из водного раствора этилового спирта.

После окончания цикла работы морских ежей промывают морской водой, дистиллированной или деминерализованной водой и далее используют для получения эхинохрома А по фармакопейной технологии.

На фиг.2 представлен состав полифенолов в биореакторе через 6 часов инкубации морских ежей в присутствии пирогаллола (анализ методом ВЖХ).

На фиг.3 представлен состав полифенолов в элюате с фильтра-ловушки (анализ методом ВЖХ).

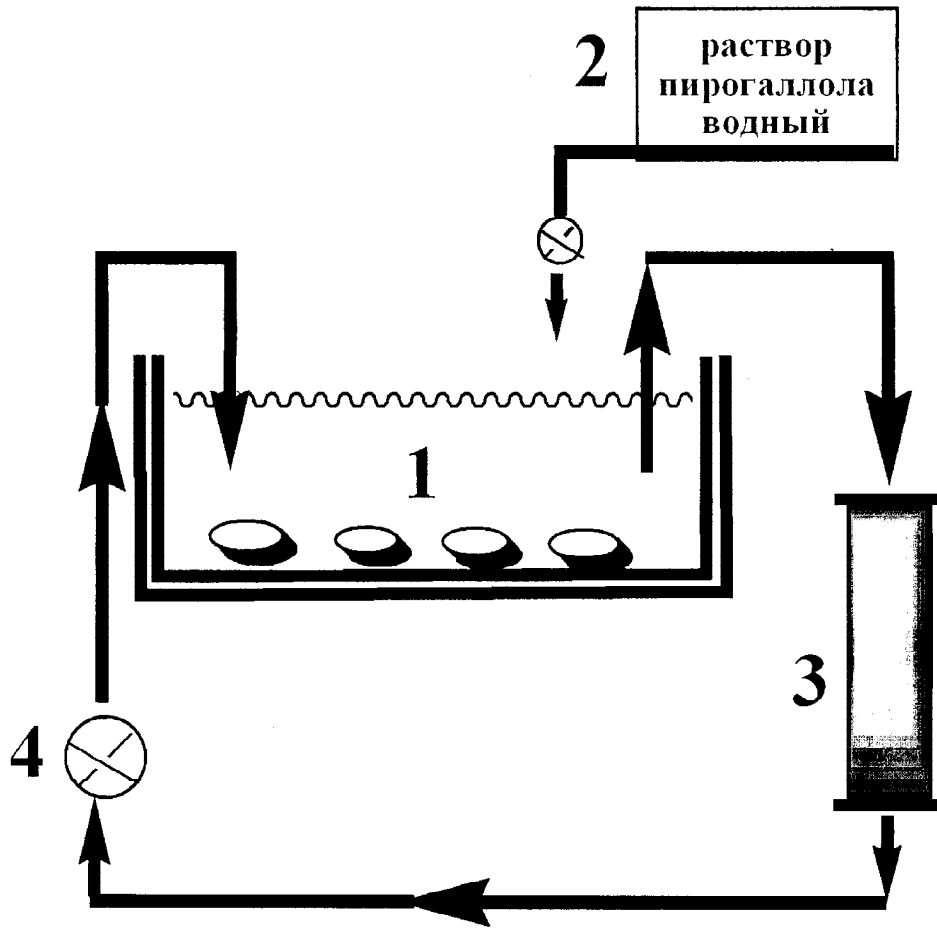
Изобретение иллюстрируется следующим примером конкретного выполнения:
ПРИМЕР.

Морских ежей вида *S. mirabilis* в количестве 0,5 кг помещают в биореактор (1) и заливают морской водой (0,5 л) при 20°C. Слой воды должен быть выше поверхности ежей на 2-3 см («зеркало»). Из емкости (2) по каплям прибавляют 50 мл раствора пирогаллола в морской воде в концентрации 5 мг/мл до конечной его концентрации в морской воде 0,5 мг/мл. Включают насос, циркулирующий воду через фильтр-ловушку (3), заполненный 0,1 кг полихроме-1. Процесс прекращают после заполнения двух третей фильтра-ловушки. Фильтр промывают дистиллированной водой (0,5 л), затем 10% водным раствором этилового спирта (0,1 л). Пурпуругаллин элюируют с сорбента 0,5 л 40% водного раствора этилового спирта и 0,5 л 60% водного раствора этилового спирта. Раствор упаривают в вакууме и кристаллизуют из 40% водного раствора этилового спирта. Ежей промывают морской, затем дистиллированной водой и выгружают из реактора.

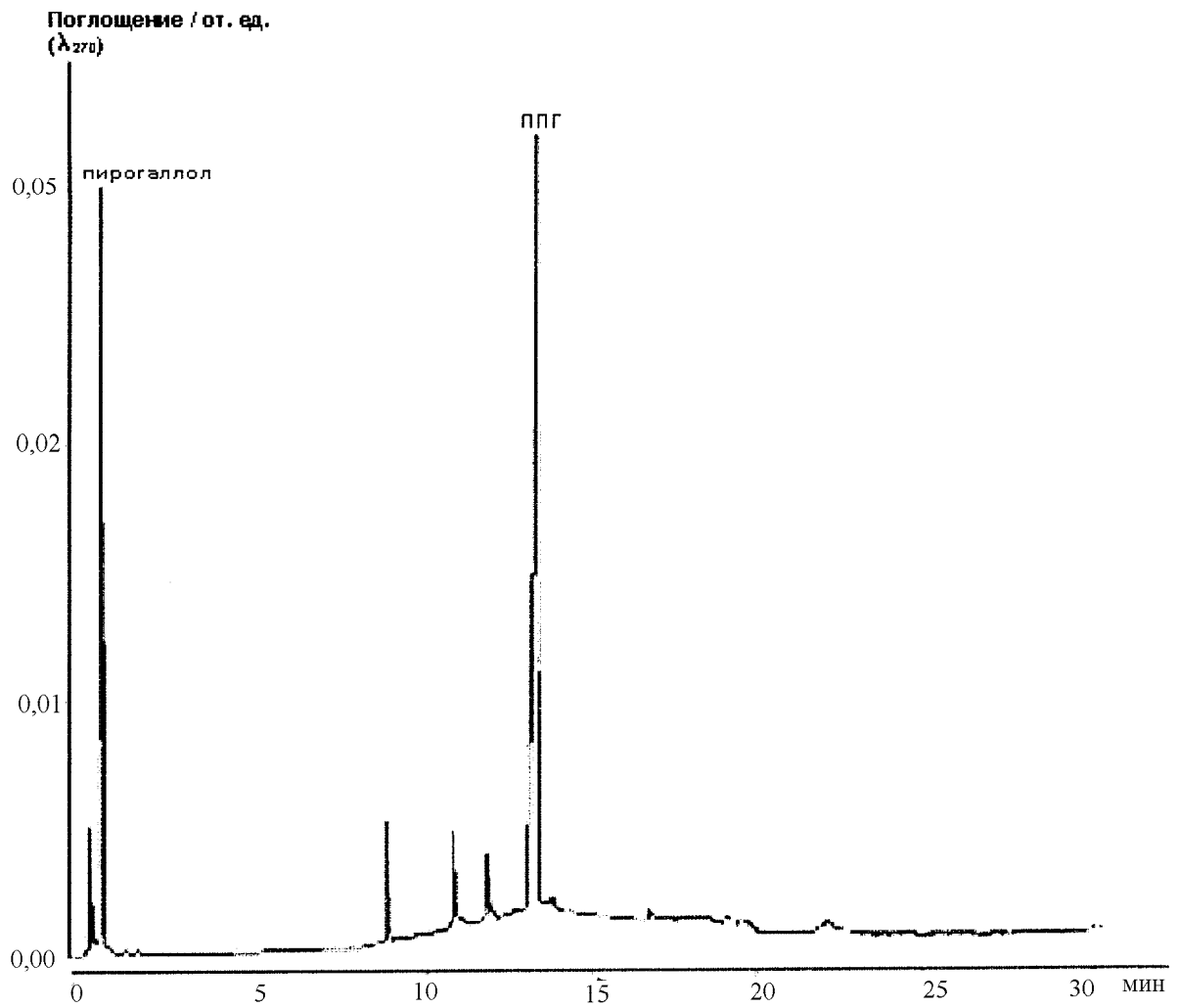
Выход пурпуругаллина составляет 750 мг за 1 цикл работы биореактора (24 часа), т.е. 75% от веса исходного сырья.

Формула изобретения

Способ получения пурпуругаллина путем ферментативного окисления пирогаллола в присутствии перекиси водорода с последующей хроматографической очисткой целевого продукта, отличающийся тем, что в качестве источника фермента и перекиси водорода используют морских ежей *Scaphechinus mirabilis*, находящихся в биореакторе с морской водой, в который при температуре 18-22°C добавляют водный раствор пирогаллола до конечной его концентрации в морской воде 0,4-0,6 мг/мл, хроматографическую очистку осуществляют на полихроме-1 с последующим элюированием целевого продукта с сорбента 40-60%-ным водным раствором этилового спирта, упариванием в вакууме и кристаллизацией из водного раствора этилового спирта.

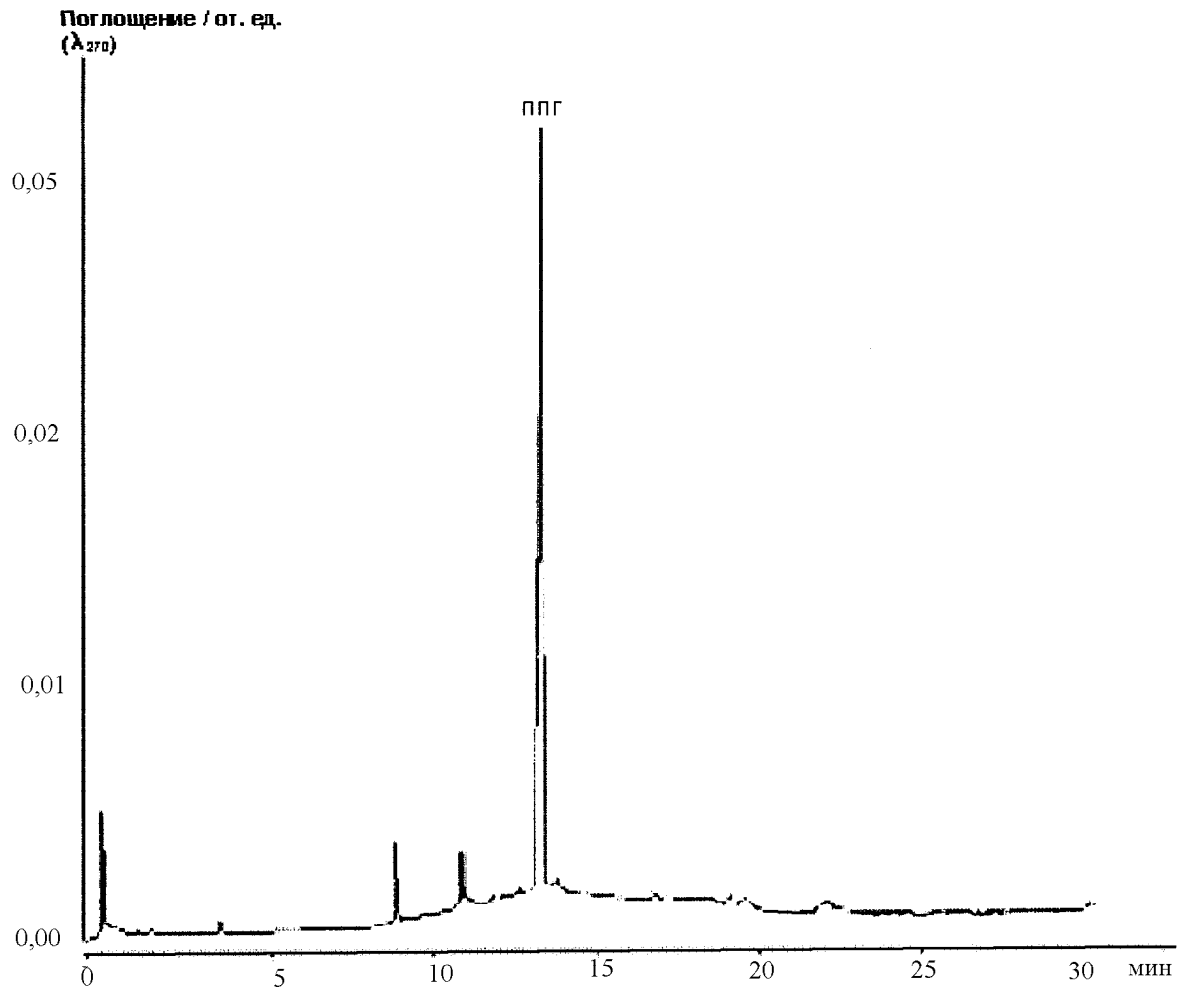


Фиг. 1



ППГ – пурпурогаллин

Фиг. 2



Фиг. 3