



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21), (22) Заявка: **2009109729/15**, 17.03.2009(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.03.2009(45) Опубликовано: **10.09.2010** Бюл. № **25**(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **RU 2305548 C1 10.09.2007. SU 1508535 A1**
27.08.1996. RU 2259824 C2 20.04.2005.

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),
Логвинов Степан Викторович (RU),
Козловская Эмма Павловна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

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

(54) СПОСОБ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ПЛОСКИХ МОРСКИХ ЕЖЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к технологии переработки плоских морских ежей. Сырье заливают 2,0-2,5%-ным водным раствором щелочи, выдерживают при температуре 70-75°C в течение 5-6 часов, далее раствор нейтрализуют серной кислотой до pH 3-5, и оставляют сырье в подкисленном растворе на 16-18 час, затем сливают его из реактора и извлекают хлороформом смесь, включающую свободные жирные кислоты (экстракт I). Далее остаток сырья в реакторе дважды экстрагируют 96%-ным этиловым спиртом настаиванием в течение 16-24 час, затем спиртовые экстракты отделяют от сырья, объединяют и концентрируют до минимального объема с последующим

извлечением из концентрата хлороформом смеси веществ, содержащих свободные жирные кислоты (экстракт II). Далее экстракты I и II объединяют и концентрируют, затем концентрат веществ растворяют в гексане и наносят на хроматографическую колонку с силикагелем для выделения свободных жирных кислот, свободных стеринов и производных каротиноидов последовательным элюированием веществ гексаном и градиентом серного эфира в гексане с последующим концентрированным целевых продуктов. Затем из концентрата свободных жирных кислот получают полиненасыщенные жирные кислоты кристаллизацией их при температуре (-25-10°C) в течение 2-3 часов. Изобретение позволяет реализовать указанное назначение. 1 з.п. ф-лы.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
A61K 35/56 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2009109729/15, 17.03.2009**

(24) Effective date for property rights:
17.03.2009

(45) Date of publication: **10.09.2010 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),
Logvinov Stepan Viktorovich (RU),
Kozlovskaja Ehmma Pavlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

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

(54) METHOD OF INTEGRATED SAND DOLLAR PROCESSING

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to sand dollar technology. The raw material is filled with 2.0 - 2.5% aqueous alkali, kept at temperature 70-75°C for 5-6 hours, further the solution is neutralised with sulphuric acid to pH 3-5 and kept in the acidulous solution for 16-18 hours, then poured out from a reactor, and a mixture containing free fatty acids (extract I) is recovered with chloroform. Further, the residue raw material in the reactor is twice extracted with 96% ethanol by infusion for 16-24 hours; then alcohol extracts are separated from the raw materials, merged and concentrated to minimum volume to recover a mixture containing free fatty

acids (extract II) from the concentrate with chloroform. Further, extract I and II are merged and concentrated, then the concentrate is dissolved in hexane and applied on a silica gel chromatographic column to recover free fatty acids, free sterols and derivative carotinoids by consecutive elution with hexane and ethyl oxide hexane gradient with the end products to be concentrated. Then concentrated free fatty acids are used to prepare polyunsaturated fatty acids by crystallisation at temperature (-25-10°C) for 2-3 hours.

EFFECT: invention allows implementing said object matter.

2 cl, 4 ex

Изобретение относится к технологии переработки плоских морских ежей с одновременным получением разных по природе биологически активных веществ: свободных жирных кислот, преимущественно полиненасыщенных, и каротиноидов, используемых в качестве добавок в пищевые продукты, медицинские препараты и косметические средства, а также в препараты для сельского хозяйства и ветеринарии. Способ позволяет дополнительно получать стерины морского происхождения высокой степени чистоты для использования в модельных опытах исследования метаболических путей образования стероидов в морских беспозвоночных из предшественников - холестерина и его производных, и в лабораторных исследованиях проблем атеросклероза и сахарного диабета.

Актуальность задачи получения жирных кислот обусловлена следующими причинами. Клинические испытания показали, что применение даже относительно низких количеств омега-3 жирных кислот приводит к существенному понижению инфарктов и коронарных болезней сердца. Показано, что омега-3 ПНЖК обладают антиканцерогенной, противоопухолевой, антимагистатической, антитромботической и антиаритмической активностями [Noda H. et al. (1990) *Hydrobiologia*, 204/205, 577-584; Roberts D.D., Ginsburg V. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.*, 267, 405-415; Carroll D.N., Roth M.T. (2002) *Ann. Pharmacotherapy*, 36, 1950-1956].

Коммерческим источником омега-3 ПНЖК до сих пор были жиры (триацилглицерины) морских рыб. Однако запасы рыбных жиров продолжают понижаться, а потребность в полиненасыщенных жирных кислотах увеличивается. В связи с этим не менее важным источником ПНЖК могут стать морские беспозвоночные и отходы их переработки, содержащие значительные количества этих кислот. Содержание липидов (сумма фосфолипидов, гликолипидов, нейтральных липидов) достигает во многих видах морских беспозвоночных значительных величин (1,0-11,7% на сырой вес ткани), в связи с чем некоторые виды морских беспозвоночных используются для выделения ПНЖК. Так гонады морских ежей давно используются в Японии для получения эйкозапентаеновой кислоты. Из печени командорского кальмара получено средство, представляющее собой липидную фракцию, содержащую 10% полиненасыщенных жирных кислот и 50% алкилдиацилглицеридов, обладающее выраженными липидкорректирующими и иммуномодулирующими свойствами [RU 2259824 C2, 10.09.2005].

Каротиноиды морских беспозвоночных обладают антиоксидантными свойствами [Bandaranayake W.M. *Nat. Prod. Rep.*, 2006, 23, 223-255]. Известно противовоспалительное, антисклеротическое, антистрессовое действие морских каротиноидов, широкое применение их для производства различных продуктов питания [Ямасита Э. Функциональные характеристики астаксантина и его применение. *Japanese J. of Phycol.* 2002, 50, 49-51].

Из плоских морских ежей получают разные по химической природе биологически активные вещества.

Известен способ получения эхинохрома А (2,3,5,7,8-пентагидроокси-6-этил-1,4-нафтохинона), 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 [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 целевого продукта из смеси диоксан-гексан.

Известен способ комплексной переработки плоских морских ежей с одновременным получением ганглиозидов и эхинохрома А, а также белкового концентрата и минеральной муки [RU 2305548 C1, 10.09.2007].

Способ заключается в том, что сырье последовательно обрабатывают: 1) водным раствором лимонной кислоты для частичного удаления нелипидных примесей и растворимых в воде пигментов, 2) водным раствором щелочи для омыления липидов в сырье, 3) спиртовым раствором лимонной кислоты для экстракции продуктов гидролиза, 4) спиртовыми растворами серной кислоты (трижды) для получения фракций, содержащих эхинохром А. После концентрирования растворов ганглиозиды извлекают гексаном из щелочного концентрата и концентрата спиртового раствора лимонной кислоты. Гексановые экстракты концентрируют до минимального объема и добавляют к ним холодный ацетон для осаждения ганглиозидов. Осадок ганглиозидов дополнительно промывают холодным ацетоном. После концентрирования спиртовых растворов серной кислоты проводится извлечение из них сначала гексаном холестерина и свободных жирных кислот, а затем - хлороформом фракции, содержащей эхинохром А, с последующей очисткой его от свободных жирных кислот и сопутствующих пигментов водным раствором хлористого магния.

Способов комплексной переработки плоских морских ежей с получением свободных жирных кислот, преимущественно полиненасыщенных, каротиноидов, а также свободных стероидов в доступной патентной и другой научно-технической литературе не обнаружено.

Задача изобретения - разработка способа комплексной переработки плоских морских ежей с получением смеси свободных жирных кислот с высоким содержанием полиненасыщенных кислот, а также веществ каротиноидной природы, свободных стероидов.

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 хиноидных пигментов и, в частности, эхинохрома А, других отличающихся от него по природе ценных биологически активных веществ, а именно свободных жирных кислот с высоким содержанием полиненасыщенных кислот, а также веществ каротиноидной природы и свободных стероидов высокой степени чистоты и с высокими выходами.

Поставленная задача решена способом комплексной переработки плоских морских ежей, в котором согласно изобретению сырье заливают 2,0-2,5%-ным водным раствором щелочи, выдерживают при температуре 70-75°C в течение 5-6 часов, далее раствор нейтрализуют серной кислотой до pH 3-5 и оставляют сырье в подкисленном растворе на 16-18 час, затем сливают его из реактора и извлекают хлороформом смесь, включающую свободные жирные кислоты (экстракт I), далее остаток сырья в реакторе дважды экстрагируют 96%-ным этиловым спиртом настаиванием в течение 16-24 час, затем спиртовые экстракты отделяют от сырья, объединяют и концентрируют до минимального объема с последующим извлечением из концентрата хлороформом смеси веществ, содержащих свободные жирные кислоты (экстракт II), далее экстракты I и II объединяют и концентрируют, затем концентрат веществ растворяют в гексане и наносят на хроматографическую колонку с силикагелем для выделения свободных жирных кислот, свободных стероидов и производных каротиноидов последовательным элюированием веществ гексаном и градиентом

серного эфира в гексане с последующим концентрированием целевых продуктов; затем из концентрата свободных жирных кислот получают полиненасыщенные жирные кислоты кристаллизацией их при температуре (-25-10°C) в течение 2-3 часов.

Плоские морские ежи, остающиеся в реакторе после извлечения целевых продуктов, используют для получения смеси хиноидных пигментов.

Таким образом, в заявляемом способе образование смеси жирных кислот происходит в сырье за счет гидролиза его липидов (триацилглицеринов и фосфолипидов) горячим (70-75°C) раствором щелочи, при этом сдвиг реакции в сторону образования свободных жирных кислот происходит в результате подкисления реакционной смеси. Экстракцию сырья после удаления из реактора подкисленного раствора продолжают спиртом для полного извлечения целевых продуктов. Предварительную очистку от примесей целевых продуктов проводят хлороформом, окончательную - с помощью колоночной хроматографии на силикагеле.

Способ позволяет получить помимо свободных жирных кислот смесь пигментов. Для этого остаток морских ежей в реакторе после процедур, описанных выше, экстрагируют при комнатной температуре в течение 2-3 часов 3,5-4,0%-ным спиртовым раствором серной кислоты (экстракт III). Повторную экстракцию проводят таким же раствором в течение 16-18 часов при комнатной температуре (экстракт IV). После концентрирования экстрактов III и IV до небольшого объема проводят извлечение хлороформом смеси пигментов, содержащих эхинохром А

Изобретение иллюстрируется следующими примерами конкретного выполнения:
Пример 1.

I. Извлечение свободных жирных кислот, свободных стероидов, каротиноидов.

5 кг плоских морских ежей помещают в десятилитровый реактор с рубашкой и заливают (с образованием «зеркала» над поверхностью сырья) 6 л 2,0%-ного водного раствора щелочи (KOH или NaOH). Температуру в реакторе 70°C обеспечивают за счет подачи в рубашку реактора горячей воды. Сырье выдерживают в щелочном растворе в течение 5 час для гидролиза триацилглицеринов и фосфолипидов. После этого щелочной раствор из реактора сливают в приемник, осторожно приливают 1,2 л 30%-ного раствора серной кислоты. Раствор перемешивают, доводят pH реакционной смеси до 3-5 и вновь подают в реактор с ежами. Смесь оставляют в реакторе с ежами на 16-18 час. После окончания процесса нейтрализации реакционную смесь сливают из реактора в реакционный сосуд с нижним сливом, далее в сосуд подают 2 л хлороформа. Смесь в сосуде перемешивают и оставляют для расслаивания на две фракции. Отбирают через нижний слив хлороформную фракцию, содержащую свободные жирные кислоты (экстракт I). Процедуру извлечения свободных жирных кислот повторяют трижды. Хлороформные экстракты объединяют, промывают 2-3 раза дистиллированной водой до нейтральной pH. Очищенный и нейтрализованный хлороформный экстракт I концентрируют до небольшого объема. Выход продукта на стадии составляет 15,0 г.

Далее остаток сырья в реакторе дважды экстрагируют 6 л 96%-ного этилового спирта настаиванием в течение 16-24 час. Процедуру повторяют дважды. Соотношение сырья и экстрагента выдерживают в пределах 1:1 по объему. Спиртовые экстракты объединяют и концентрируют до 1,0-1,5 л, далее к спиртовому раствору добавляют равный объем хлороформа и воду (0,5 л). Смесь перемешивают и оставляют до расслоения на две фазы. Отбирают хлороформную фазу (экстракт II), промывают ее дважды водой и концентрируют до небольшого объема. Выход продукта на этой стадии составляет 7,5 г.

Экстракты I и II объединяют, концентрируют досуха и растворяют в 0,5 литрах гексана. Очистку свободных жирных кислот из объединенных экстрактов I и II проводят на хроматографической колонке с 500 г силикагеля (размер частиц 40/100 или 100/160 микрон). Для этого 0,5 л гексанового раствора загружают на колонку.

Элюирование веществ с колонки проводят гексаном и ступенчатым градиентом серного эфира в гексане. Ход элюирования каротиноидных пигментов, свободных жирных кислот, стериннов контролируют тонкослойной хроматографией (ТСХ), используя систему для разделения липидов, состоящую из гексана, серного эфира и уксусной кислоты, взятых в объемных соотношениях 80:20:1.

Концентрирование продуктов ведут на вакуумном роторном испарителе при температуре водяной бани 45-50°C досуха. Выход свободных жирных кислот составляет 11,0 г, каротиноидных пигментов - 1,1 г, свободных стериннов - 7,0 г. По данным ТСХ чистота целевых продуктов в пределах 98-99%.

Концентрат свободных жирных кислот (11,0 г) отправляют на процедуру кристаллизации насыщенных жирных кислот вымораживанием их при температуре -10-25°C. Через 2-3 часа вымораживания отделяют жидкую фазу ненасыщенных жирных кислот от твердой фазы насыщенных жирных кислот. В жидкой фракции определяют массовое содержание жирных кислот взвешиванием аликвоты раствора, высушенного до постоянного веса. Выход жирных кислот составляет 7,5 г с содержанием ПНЖК омега-3 серии в пределах 45-65%.

Остаток морских ежей в реакторе направляют на процедуру получения смеси хиноидных пигментов, одним из компонентов которой является эхинохром А.

II. Извлечение смеси хиноидных пигментов.

Остаток морских ежей в реакторе заливают 6 л 3,5%-ного спиртового раствора серной кислоты и экстрагируют настаиванием при комнатной температуре в течение 3 час (экстракт I). Повторную экстракцию пигментов из ежей проводят таким же раствором в течение 16-18 часов при комнатной температуре (экстракт II). После концентрирования экстрактов I и II до 2 л, проводят извлечение смеси пигментов хлороформом: к 2 л спиртового концентрата добавляют 2 л хлороформа и 1 л воды. Смесь перемешивают и оставляют для разделения на две фракции. Отбирают хлороформную фракцию. Из верхней водно-спиртовой фракции повторно хлороформом извлекают пигменты. Хлороформные фракции объединяют и отмывают остаток серной кислоты дистиллированной водой до нейтральной pH. Хлороформный экстракт выпаривают досуха (выход 5,5 г, содержание эхинохрома А в смеси 30%, что составляет порядка 80% от его содержания в морских ежах).

Пример 2.

5 кг замороженных плоских ежей подвергают процедурам, описанным в примере 1. Однако обработку ежей проводят 2,5%-ным водным раствором щелочи при температуре в пределах 75°C в течение 3 часов. Щелочной раствор сливают, нейтрализуют. Далее pH доводят до 4-5 и извлекают свободные жирные кислоты, как описано в примере 1. В этом случае гидролиз липидов проходит неполно (примерно на 60%), что приводит лишь к увеличению в липидной смеси свободных жирных кислот.

Пример 3. Выполняется аналогично примеру 1, но гидролиз липидов осуществляют при 45°C в течение суток 2,5%-ным раствором щелочи. В этом случае триацилглицерины, фосфолипиды из-за их неполного гидролиза составляют примеси, а выход свободных жирных кислот составляет порядка 40%.

Пример 4. Выполняется аналогично примеру 1, за исключением того, что процедура

проводится при комнатной температуре в течение 18-24 часов. В этих условиях процедура омыления липидов проходит частично (примерно на 20%), что приводит лишь к увеличению в липидной смеси свободных жирных кислот на фоне триацилглицеринов, непредельных углеводов, стероидов, фосфолипидов и гликолипидов.

Формула изобретения

1. Способ комплексной переработки плоских морских ежей, отличающийся тем, что сырье заливают 2,0-2,5%-ным водным раствором щелочи, выдерживают при температуре 70-75°C в течение 5-6 ч, далее раствор нейтрализуют серной кислотой до рН 3-5 и оставляют сырье в подкисленном растворе на 16-18 ч, затем сливают его из реактора и извлекают хлороформом смесь, включающую свободные жирные кислоты (экстракт I), далее остаток сырья в реакторе дважды экстрагируют 96%-ным этиловым спиртом настаиванием в течение 16-24 ч, затем спиртовые экстракты отделяют от сырья, объединяют и концентрируют до минимального объема с последующим извлечением из концентрата хлороформом смеси веществ, содержащих свободные жирные кислоты (экстракт II); далее экстракты I и II объединяют и концентрируют, затем концентрат веществ растворяют в гексане и наносят на хроматографическую колонку с силикагелем для выделения свободных жирных кислот, свободных стероидов и производных каротиноидов последовательным элюированием веществ гексаном и градиентом серного эфира в гексане с последующим концентрированием целевых продуктов; затем из концентрата свободных жирных кислот получают полиненасыщенные жирные кислоты кристаллизацией их при температуре (-25-10°C) в течение 2-3 ч.

2. Способ по п.1, в котором остатки плоских морских ежей используют для получения смеси хиноидных пигментов.