



(51) МПК
C11B 11/00 (2006.01)
C07J 75/00 (2006.01)
C07J 9/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015120087/04, 27.05.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 27.05.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.05.2015

(45) Опубликовано: 10.11.2016 Бюл. № 31

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: RU 2086616 C1, 10.08.1997. RU 2469732
 C1, 20.12.2012. JP 0060038325 A, 27.02.1985. RU
 2509775 C1, 20.03.2014.

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100 лет
 Владивостоку, 159, ФГБУН Тихоокеанский
 институт биорганической химии им. Г.Б.
 Елякова Дальневосточного отделения РАН, зав.
 патентным отделом Стадниченко Н.И.

(72) Автор(ы):

Артюков Александр Алексеевич (RU),
 Кочергина Татьяна Юрьевна (RU),
 Купера Елена Владимировна (RU),
 Рудцова Татьяна Анатольевна (RU),
 Задорожный Павел Анатольевич (RU),
 Елькин Юрий Николаевич (RU),
 Маханьков Вячеслав Валентинович (RU),
 Козловская Эмма Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 учреждение науки Тихоокеанский институт
 биорганической химии им. Г.Б. Елякова
 Дальневосточного отделения Российской
 академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВОСКА И СТЕРИНОВ ИЗ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *Patiria pectinifera*

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения воска и стеринов из морской звезды *Patiria pectinifera*. Способ включает экстракцию сырья 96% раствором этилового спирта, процедуру повторяют трижды, объединенные экстракты упаривают, затем полученный концентрат разбавляют дистиллированной водой до содержания этилового спирта 20-30%, далее полученный раствор фильтруют и пропускают через колонку с DEAE-целлюлозой, уравновешенную 30% раствором этилового спирта, посторонние примеси отмывают градиентом этилового спирта (40→55%), а фракцию, содержащую воск и стерин, элюируют с сорбента градиентом этилового спирта (65→96%); затем элюат упаривают,

концентрированный остаток растворяют в 96% этиловом спирте, фильтруют, далее полученный раствор вымораживают при температуре -18 - -20°C в течение 24 ч; затем выпавший осадок центрифугируют, промывают холодным 96% этиловым спиртом, высушивают на воздухе; затем полученный белый порошок, содержащий суммарную фракцию воска и стерин, наносят на хроматографическую колонку с силикагелем и элюируют воск гексаном, далее элюат упаривают в вакууме и сушат, затем элюируют стерин градиентом гексан → ацетон, элюат упаривают в вакууме и сушат. Изобретение обеспечивает расширение спектра биологически активных веществ, получаемых из морской звезды *Patiria pectinifera*. 3 ил., 1 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C11B 11/00 (2006.01)
C07J 75/00 (2006.01)
C07J 9/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2015120087/04, 27.05.2015**(24) Effective date for property rights:
27.05.2015

Priority:

(22) Date of filing: **27.05.2015**(45) Date of publication: **10.11.2016** Bull. № 31

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let Vladivostoku,
159, FGBUN Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii im. G.B. Eljakova
Dalnevostochnogo otdelenija RAN, zav. patentnym
otdelom Stadnichenko N.I.**

(72) Inventor(s):

**Artjukov Aleksandr Alekseevich (RU),
Kochergina Tatjana JUrevna (RU),
Kupera Elena Vladimirovna (RU),
Rutskova Tatjana Anatolevna (RU),
Zadorozhnyj Pavel Anatolevich (RU),
Elkin JUrij Nikolaevich (RU),
Makhankov Vjacheslav Valentinovich (RU),
Kozlovskaja Emma Pavlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii im. G.B. Eljakova
Dalnevostochnogo otdelenija Rossijskoj
akademii nauk (TIBOKH DVO RAN) (RU)**

(54) **METHOD OF PRODUCING WAX AND STEROLS FROM Patiria pectinifera STARFISH**

(57) Abstract:

FIELD: technological processes.

SUBSTANCE: invention relates to method of producing wax and sterols from *Patiria pectinifera* starfish. Method involves extraction of raw material with 96 % ethanol, procedure is repeated three times, combined extracts are evaporated, then obtained concentrate is diluted with distilled water to content of ethyl alcohol of 20-30 %, then produced solution is filtered and passed through column with DEAE cellulose, balanced with 30 % solution of ethyl alcohol, foreign impurities are washed with gradient of ethyl alcohol (40→55 %), and fraction containing wax and sterols, is eluted from sorbent with gradient of ethyl alcohol (65→96 %); then eluate is evaporated,

concentrated residue is dissolved in 96 % ethanol, filtered, then obtained solution is frozen at temperature of -18...-20 °C for 24 hours; then precipitate is centrifuged, is washed with cold 96 % ethanol, dried in air; then obtained white powder containing total wax and sterols fraction, is applied onto chromatographic column with silica gel and wax is eluted with hexane, then eluate is evaporated in vacuum and dried, then sterols are eluted with hexane → acetone gradient, eluate is evaporated in vacuum and dried.

EFFECT: invention provides wider spectrum of biologically active substances obtained from *Patiria pectinifera* starfish.

1 cl, 3 dwg, 1 ex

Изобретение относится к технологии переработки природных объектов и касается способа получения воска и стеринов из морской звезды *Patiria pectinifera*.

Воски представляют собой сложные эфиры высших жирных кислот и высших высокомолекулярных спиртов и могут быть минерального, животного, растительного и морского происхождения. Воски устойчивы к действию света, окислителей, нагреванию. Они применяются для уплотнения мазевых основ, кремов [RU 2277410 C2, 20.01.2006; RU 2290170 C1, 27.12.2006; RU 2480199 C2, 20.01.2013], повышают вязкость жиров и углеводов [RU 2167536 C1, 27.05.2001]. Воски используются в составе пищевых композиций [RU 2100938 C2, 10.01.1998; RU 2302743 C2, 20.07.2007; RU 2476076 C2, 27.02.2013], в составе фармацевтических и лечебно-профилактических средств [RU 2396081 C1, 10.08.2010; RU 2497376 C2, 10.11.2013], в составе сельскохозяйственной композиции в качестве кондиционирующего агента [RU 2291847 C2, 20.01.2007].

Среди животных восков одним из наиболее значимых является спермацет, который добывали из черепных полостей и тела кашалота и некоторых других видов китов [Wellendorf M. // Nature. 1963. V. 198. P. 1086-1087]. Спермацет широко используется в парфюмерно-косметической промышленности. Он оказывает противовоспалительное, регенерирующее, ранозаживляющее, защитное действие, входит в состав биологически активных добавок [RU 2102062 C1, 20.01.1998; RU 2238092 C2, 20.10.2004; RU 2161887 C1, 20.01.2001]. В связи с запретом на китобойный промысел природный спермацет в составе кремов и мазей чаще всего заменяют импортными синтетическим цетилпальмитатом или киталаном.

Стерины - гидроароматические нейтральные спирты, являющиеся производным стероидов. Известны зоостерины, фитостерины и микостерины. Значительное количество стеринов содержится в гидробионтах: моллюсках, голотуриях, а также в спермацете кашалотов [Drazen J.C. // Comp. Biochem. and Physiol. 2008. V. 151 B. P. 79-87; Кандюк Р.П. // Экологические проблемы Черного моря: Сб. научн. ст./ ОЦНТЭИ; Одесса: ОЦНТЭИ. 1999. с. 330; Morris R.J. // Deep-Sea Research. 1973. V. 20. P. 911-916], и в ряде растительных объектов [RU 2015150 C1, 30.06.1994; RU 2238291 C1, 20.10.2004]. Стерины используются для приготовления медицинских, косметологических препаратов, БАД к пище [RU 2271820 C1, 20.03.2006; RU 2283318 C1, 10.09.2006; RU 2205015 C2, 27.05.2003; RU 2188563 C2, 10.09.2002; RU 2303373 C2, 27.07.2007; RU 2426452 C2, 20.08.2011].

Известен способ получения липидов, стеролов и жирно-кислотных композиций из голотурий и офиур [Drazen J.C. // Comp. Biochem. and Physiol. 2008. V. 151 B. P. 79-87]. Сущность способа состоит в следующем. У всех образцов удаляют внутренности, образцы лиофильно высушивают, измельчают, экстрагируют системой метанол-хлороформ-вода (2:1:0,8), фазы разделяют добавлением смеси хлороформ-вода. Экстракт концентрируют при температуре 40°C. Фракции разделяют методом двумерной бумажной хроматографии, получают воски, стеролы, свободные жирные кислоты и фосфолипиды. Фракции анализируют спектрофотометрическими методами.

Известен способ получения цетилпальмитата из кораллов *Madrepora cervicornis* [Lester D. et al. // J. Org. Chem. 1941. V. 6. P. 120-122]. Кораллы измельчают, экстрагируют в аппарате Сокслета ацетоном в течение 24 часов. Экстракт концентрируют и охлаждают. Выпавший кристаллический осадок фильтруют, промывают разбавленным ацетоном и высушивают в вакууме, затем перекристаллизовывают из ацетона.

Вышеописанные способы являются лабораторными и для промышленного производства непригодны (используются токсичные и пожароопасные реактивы). Полученные продукты применяют в лабораторных структурных исследованиях.

Среди морских гидробионтов перспективным источником биологически активных

веществ являются морские звезды. Наличие в их пищевом рационе широкого диапазона различных субстратов обеспечивает возможность накопления в организме этих иглокожих разных по природе биологически активных соединений, не являющихся продуктом их собственного биосинтеза.

5 Известен способ получения ненасыщенных жирных кислот и стерола (эргоста-7, 22-диен-3-ола) из морской звезды *Marthasterias glacialis* [Pereira D.M. et al. // PLoS ONE. 2014 V. 9. N. 2. P. e8834]. Сущность этого способа состоит в следующем. Образцы замораживают, лиофильно высушивают и измельчают. Порошок экстрагируют системой ацетон-метанол (7:3) до полного обесцвечивания порошка. Экстракт помещают в делительную воронку с равным количеством смеси эфир-гексан (1:1). Добавляют 5% раствор NaCl в эквивалентном объеме. Смесь разделяют на две фазы. Верхнюю органическую фазу промывают водой и упаривают досуха. Состав фракций определен методом хромато-масс-спектрометрии с использованием газовой хроматографии. Метод лабораторный, для промышленного производства непригоден.

15 Способов одновременного получения восков и стеринов из морских звезд в доступной патентной и другой научно-технической литературе не обнаружено.

Одним из наиболее распространенных видов морских звезд залива Петра Великого Японского моря является *Patiria pectinifera*. Эти хищные иглокожие в массовом количестве скапливаются возле марикультурных огородов. Известно использование этого вида морских звезд для производства каротиноидных препаратов [RU 2469732 C1, 20.12.2012] и коллагена [RU 2509775 C1, 20.03.2014].

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в расширении спектра биологически активных веществ, получаемых из *Patiria pectinifera*.

В результате осуществления изобретения получают три продукта.

25 1. Комплекс воска и стеринов, который может служить основой для разработки новых фармацевтических и лечебно-профилактических средств, а также новых БАД к пище.

2. Воск - основа для уплотнения мазевых основ, кремов, смягчения и улучшения эластичности пищевых композиций.

30 3. Стерины - биологически активные вещества в составе фармацевтических композиций и БАД к пище, применяемые для профилактики и в комплексной терапии атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.

Заявляемый способ получения воска и стеринов из морской звезды *Patiria pectinifera* характеризуется простотой, технологичностью, использованием стандартного оборудования, доступных недорогих реактивов, воспроизводимостью, наличием достаточного количества возобновляемых сырьевых ресурсов.

Способ заключается в следующем.

В качестве сырья используют свежельвовленных или замороженных, или законсервированных морских звезд *Patiria pectinifera*. Сырье сортируют, отделяют от посторонних примесей и морских гидробионтов других видов, помещают на сетчатый фильтр, промывают морской или пресной технической водой от песка и ила, подсушивают потоком воздуха при температуре 18-24°C. Замороженных морских звезд предварительно размораживают, сортируют, промывают, водой на сетчатом фильтре и подсушивают.

45 Подготовленное сырье заливают 96% этиловым спиртом при соотношении сырье : экстрагент 1:(1-1,2), оставляют на экстракцию в течение 18-24 ч. Экстракцию повторяют трижды. Экстракты объединяют, упаривают в вакууме при температуре 60°C. Полученный концентрат разводят дистиллированной водой до содержания этилового

спирта 20-30%. Затем водно-этанольный раствор фильтруют через тканевой фильтр и наносят на ионообменную колонку с DEAE-целлюлозой, уравновешенную 30% этиловым спиртом. Колонку предварительно отмывают от сопутствующих примесей градиентом этанола (40→55%). Затем элюируют липидную фракцию градиентом этанола (65→96%).
 5 Полученный раствор (элюат) упаривают в вакууме при температуре 60-70°C до полного удаления растворителя. Остаток растворяют в 96% этиловом спирте, раствор фильтруют через бумажный фильтр или центрифугируют и помещают в холодильник при -18 -
 -20°C на 24 ч для вымораживания из этанольного раствора соединений липидной природы (восков, стеринов). Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием
 10 при -18 - -20°C, промывают холодным 96% этиловым спиртом и сушат от остатка этанола на воздухе. Получают белый порошок - суммарный препарат восков и стеринов. Выход продукта составляет 3% от веса исходного сырья.

Полученный белый порошок наносят сухим способом на хроматографическую колонку с силикагелем. Колонку промывают гексаном, а затем градиентом гексан →
 15 ацетон в соотношении (8:2→7:3). Фракция, элюируемая гексаном, содержит природный воск. Методом хромато-масс-спектрометрии с использованием газовой хроматографии установлено, что полученный природный воск морской звезды *P. pectinifera* преимущественно имеет молекулярный ион с молекулярной массой 518 Да ($C_{35}H_{66}O_2$), что соответствует гептадеканолу линолевой кислоты.

20 Фракция, элюируемая градиентом гексан → ацетон, содержит смесь стеринов. Анализ полученных соединений выполняли методом хромато-масс-спектрометрии с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ). Определен качественный состав фракции стеринов: холеста-2,4-диен; эргоста-7,22-диен-3-ол; ацетат стигмаста-5,22-диен-3-ола; стигмаст-5-ен-3-ол.

25 Хромато-масс-спектрометрию с использованием газовой хроматографии (ГХ/МС) проводили на газовом хроматографе HP-6890 с масс-спектрометрической приставкой HP-5973, капиллярной колонкой HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane 30m. Хромато-масс-спектрометрию с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ/МС) проводили на LS-MS 2010 Shimadzu.

30 На фиг. 1 представлена хромато-масс-спектрометрия суммарного препарата воска и стеринов морской звезды *P. pectinifera*.

А. ГХ спектр суммарного препарата воска и стеринов. Пики со временем удерживания 15.29, 18.12, 18.78, 21.93 мин соответствуют стеринам; пик 30.86 мин - воска.

В. МС спектр пика воска со временем удерживания 30.86 мин.

35 На фиг. 2 представлена хромато-масс-спектрометрия с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ спектр фракций стеринов морской звезды *P. pectinifera*).

На фиг. 3 представлены МС спектры фракций стеринов морской звезды *P. pectinifera* (пики 1-4 фиг. 2). 1. Холеста-2,4-диен; 2. Эргоста-7,22-диен-3-ол; 3. Ацетат стигмаста-
 40 5,22-диен-3-ола; 4. Стигмаст-5-ен-3-ол.

Изобретение иллюстрируется следующим примером.

ПРИМЕР

Сырье - свежельовленных морских звезд вида *Patiria pectinifera* в количестве 1,0 кг очищают от посторонних примесей, помещают на сетчатый фильтр, промывают морской
 45 или технической пресной водой от песка и ила и подсушивают, при необходимости, потоком воздуха при температуре 18-24°C.

Подготовленное сырье загружают в эмалированный реактор, или полимерную емкость, или другую, разрешенную для контакта с пищевыми продуктами, и заливают

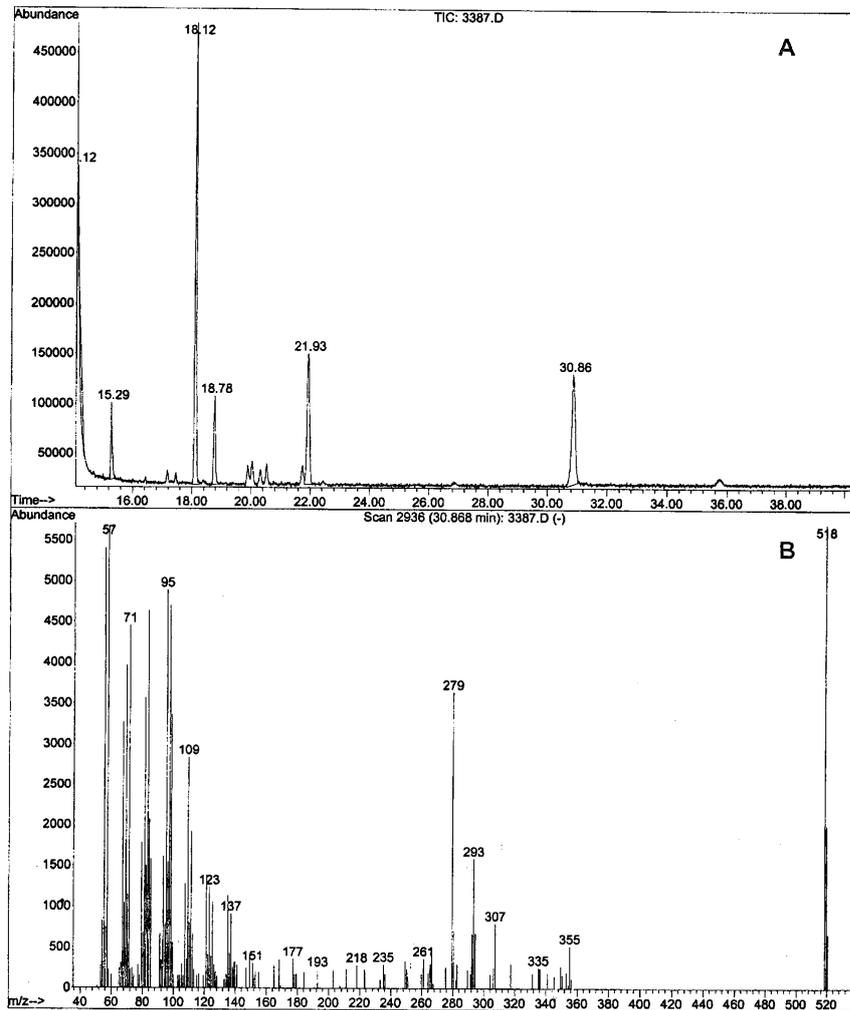
96% этиловым спиртом «под зеркало» (1-1,2 л). Экстракция происходит в течение 20 ч. Полученный этанольный экстракт сливают в накопительную емкость. Повторяют процесс экстракции трехкратно. Объединенный этанольный экстракт упаривают в вакууме при температуре 60°C. Отгон этилового спирта возвращают на повторное экстрагирование сырья.

Концентрат доводят дистиллированной водой до содержания этилового спирта 25%. Водно-этанольный раствор фильтруют через тканевой фильтр и наносят на ионообменную колонку с DEAE-целлюлозой, уравновешенную 30% этиловым спиртом. Колонку последовательно отмывают от сопутствующих примесей ступенчатым градиентом этанола (40→55%). Фракцию, содержащую воск и стеринны, элюируют с сорбента градиентом этанола (65→96%). Полученный элюат упаривают в вакууме при температуре 60-70°C. Концентрированный остаток растворяют в небольшом количестве 96% этилового спирта. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр или центрифугируют и помещают в холодильник при -19°C на 24 ч. Выпавший на холоде осадок, содержащий воск и стеринны, отделяют центрифугированием при -19°C, промывают холодным 96% этиловым спиртом (-19°C) и высушивают на воздухе. Получают белый порошок, содержащий суммарную фракцию воска и стериннов (30 г).

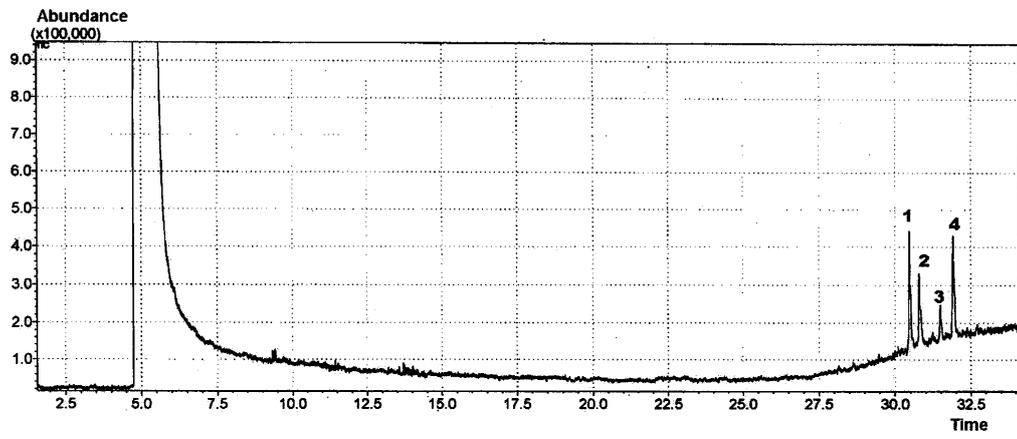
Для разделения воска и стериннов полученный белый порошок (30 г) наносят сухим способом на хроматографическую колонку с силикагелем. Колонку промывают гексаном, элюат упаривают в вакууме. Получают 17 г природного воска. Затем колонку элюируют градиентом гексан → ацетон в соотношении (8:2→7:3). После упаривания получают смесь стериннов в количестве 10 г.

Формула изобретения

Способ получения воска и стериннов из морской звезды *Patiria pectinifera*, характеризующийся тем, что сырье промывают водой и подвергают экстракции 96% раствором этилового спирта в течение 18-24 ч при соотношении сырье:экстрагент 1:(1-1,2), процедуру повторяют трижды, объединенные экстракты упаривают, полученный концентрат разбавляют дистиллированной водой до содержания этилового спирта 20-30%, далее полученный раствор фильтруют и пропускают через колонку с DEAE-целлюлозой, уравновешенную 30% раствором этилового спирта, посторонние примеси отмывают градиентом этилового спирта (40→55%), а фракцию, содержащую воск и стеринны, элюируют с сорбента градиентом этилового спирта (65→96%); затем элюат упаривают в вакууме при температуре 60-70°C, концентрированный остаток растворяют в 96% этиловом спирте, фильтруют, далее полученный раствор вымораживают при температуре -18 - -20°C в течение 24 ч; затем выпавший осадок центрифугируют при -18 - -20°C, промывают холодным 96% этиловым спиртом, высушивают на воздухе; затем полученный белый порошок, содержащий суммарную фракцию воска и стериннов, наносят на хроматографическую колонку с силикагелем и элюируют воск гексаном, далее элюат упаривают в вакууме и сушат, затем элюируют стеринны градиентом гексан → ацетон (8:2→7:3), элюат упаривают в вакууме и сушат.

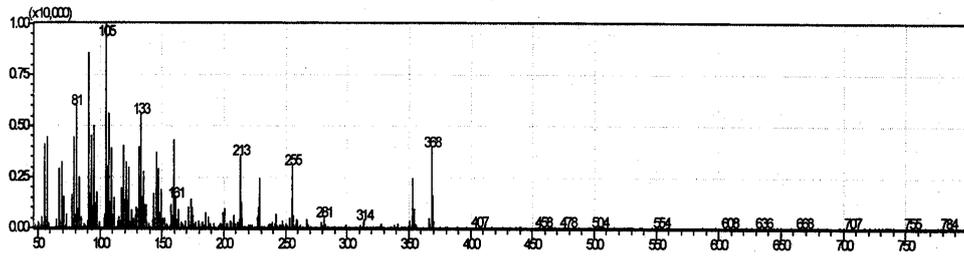


Фиг. 1

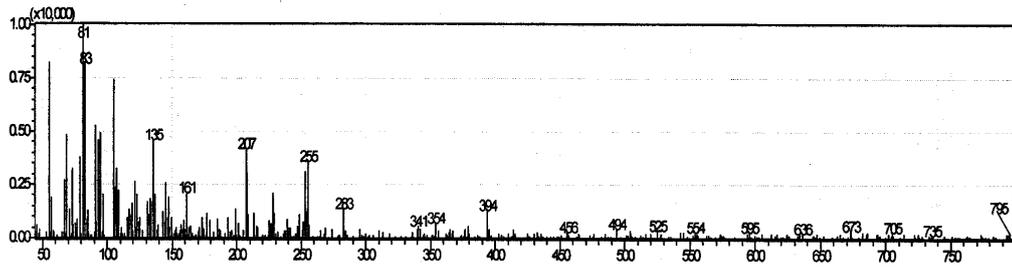


Фиг. 2

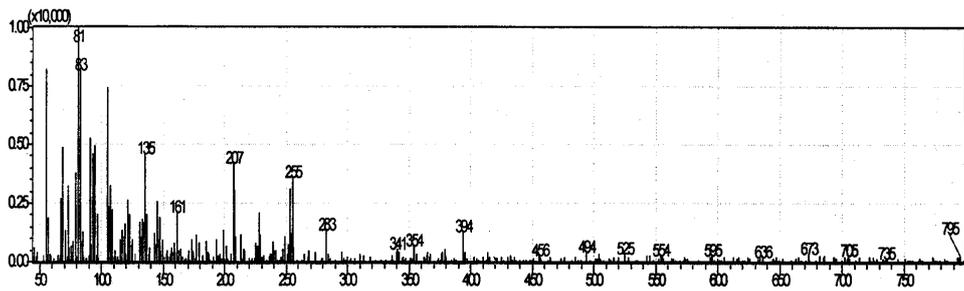
1. Холеста-2,4-диен



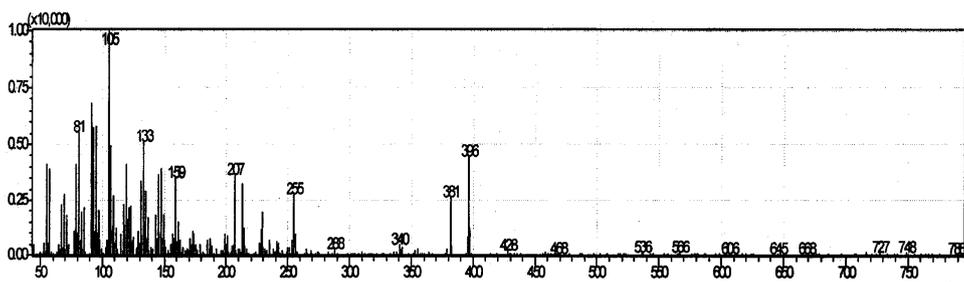
2. Эргоста-7,22-диен-3-ол



3. Ацетат стигмаста-5,22-диен-3-ола



4. Стигмаст-5-ен-3-ол



Фиг. 3