



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
C07C 46/00 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2019116817, 24.05.2019  
с присоединением заявки №2018114590

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
24.05.2019

Дата регистрации:  
13.08.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.05.2019

(23) Дата поступления дополнительных материалов  
к ранее поданной заявке: 07.02.2019,  
2018114590 19.04.2018

(45) Опубликовано: 13.08.2019 Бюл. № 23

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Артюков Александр Алексеевич (RU),  
Купера Елена Владимировна (RU),  
Руцкова Татьяна Анатольевна (RU),  
Кочергина Татьяна Юрьевна (RU),  
Маханьков Вячеслав Валентинович (RU),  
Козловская Эмма Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2352554 C1, 20.04.2009. RU  
2283298 C1, 10.09.2008. D.V. Berdyshev et al. 7-  
Ethyl-2,3,5,6,8-pentahydroxy-1,4-naphthoquinone  
(echinochrome A): a DFT study of the mechanism  
of the antioxidant action. 4. Migration of protons  
and the Na<sup>+</sup> cation in echinochrome a  
monosodium salts. Russian Chemical Bulletin,  
2011, 60(4), 639-646. V.P. Glazunov et al. (см.  
прод.)

(54) Способ получения водорастворимой солевой формы эхинохрома А, пригодной для использования в фармакологической и пищевой промышленности

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения водорастворимой моносодиевой соли эхинохрома А из плоских морских ежей, пригодной для использования в фармакологической и пищевой промышленности. Способ характеризуется тем, что свежельовленное или дефростированное сырье предварительно промывают питьевой водой, подсушивают, заливают 96% этиловым спиртом с добавлением аскорбиновой кислоты при соотношении сырье : этиловый спирт : аскорбиновая кислота 1:(1,0-1,2):(0,003-0,005) (кг : л : кг) и экстрагируют при комнатной

температуре в течение 22-26 ч, затем полученный экстракт сливают и упаривают, далее концентрированный остаток разбавляют дистиллированной водой и пропускают через колонку с полихромом 1, затем пигментные фракции элюируют 40% этиловым спиртом, элюат упаривают досуха, далее обезжиренное сырье подвергают двукратной экстракции 96% этиловым спиртом с добавлением фосфорной кислоты при комнатной температуре в соотношении сырье : этиловый спирт : фосфорная кислота 1:(1,0-1,2):(0,002-0,005) (кг : л : кг) в течение 22-26 ч, затем полученные экстракты

сливают, объединяют и упаривают, а сухой остаток, полученный на стадии экстракции, объединяют с концентратом элюата и промывают дистиллированной водой. Далее концентрат растворяют в 1,0% водном растворе бикарбоната натрия в соотношении концентрированный остаток : содовый раствор 1:(1,5-2,0) (кг : л), затем полученный раствор центрифугируют, осадок

отбрасывают, а полученный водный раствор, содержащий моносодиевую соль эхинохрома А, высушивают на лиофильной или распылительной сушилке с получением целевого продукта. Предлагаемый способ позволяет получить моносодиевую соль эхинохрома А, хорошо растворимую в воде, без потери функциональных свойств, присущих эхинохрому А. 4 ил., 2 пр.

(56) (продолжение):

7-Ethyl-2,3,5,6,8-pentahydroxy-1,4-naphthoquinone (echinochrome A): a DFT study of the antioxidant mechanism  
2.\* The structure of monosodium salts of echinochrome A and their reactions with the hydroperoxyl radical. Russian Chemical Bulletin, 2010, 59(1), 43-54.

RU 2697197 C1

RU 2697197 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07C 46/00* (2006.01)  
*C07C 50/32* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*C07C 46/00* (2019.05)

(21)(22) Application: **2019116817, 24.05.2019**  
with connected application(s) 2018114590

(24) Effective date for property rights:  
**24.05.2019**

Registration date:  
**13.08.2019**

Priority:

(22) Date of filing: **24.05.2019**

(23) Date of filing the supplementary materials of the  
earlier submitted application: **07.02.2019,**  
**2018114590 19.04.2018**

(45) Date of publication: **13.08.2019** Bull. № 23

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Artyukov Aleksandr Alekseevich (RU),  
Kupera Elena Vladimirovna (RU),  
Rutskova Tatyana Anatolevna (RU),  
Kochergina Tatyana Yurevna (RU),  
Makhankov Vyacheslav Valentinovich (RU),  
Kozlovskaya Emma Pavlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoj khimii im. G.B. Elyakova  
Dalnevostochnogo otdeleniya Rossijskoj  
akademii nauk (TIBOKH DVO RAN) (RU)**

(54) **METHOD OF PRODUCING WATER-SOLUBLE SALT FORM OF ECHINOCHROME A, SUITABLE FOR USE IN PHARMACOLOGICAL AND FOOD INDUSTRY**

(57) Abstract:

FIELD: technological processes.

SUBSTANCE: invention relates to a method of producing water-soluble monosodium salt of echinochrome A from sand dollar suitable for use in pharmacological and food industry. Method is characterized by that the freshly caught or defrosted raw material is preliminarily washed with drinking water, dried, poured with 96 % ethyl alcohol with addition of ascorbic acid at ratio of raw materials : ethyl alcohol : ascorbic acid 1:(1.0–1.2):(0.003–0.005) (kg : l : kg) and extracted at room temperature for 22–26 hours, then obtained extract is drained and evaporated, then the concentrated residue is diluted with distilled water and passed through the column with polychrome 1, then the pigment fractions are eluted with 40 % ethyl alcohol, the eluate is evaporated to dryness, then defatted raw material is subjected to double extraction

with 96 % ethyl alcohol with addition of phosphoric acid at room temperature in ratio of raw materials : ethyl alcohol : phosphoric acid 1:(1.0–1.2):(0.002–0.005) (kg : l : kg) for 22–26 hours, then obtained extracts are drained, combined and evaporated, and the dry residue obtained at the extraction step is combined with the eluate concentrate and washed with distilled water. Further, the concentrate is dissolved in 1.0 % aqueous solution of sodium bicarbonate in ratio of concentrated residue : soda solution 1:(1.5–2.0) (kg : l), then obtained solution is centrifuged, residue is discarded, and obtained aqueous solution containing echinochrome A monosodium salt is dried on lyophilic or spray drier to produce target product.

EFFECT: disclosed method enables to obtain echinochrome A monosodium salt which is well soluble in water without loss of functional properties inherent

R U 2 6 9 7 1 9 7 C 1

R U 2 6 9 7 1 9 7 C 1

Изобретение относится к способу получения водорастворимой солевой формы эхинохрома А из плоских морских ежей, конкретно к его моносодовой соли, пригодной для использования в фармакологической и пищевой промышленности в качестве активного ингредиента для производства биологически активных добавок к пище (БАД) и функциональных продуктов питания (ФПП).

Эхинохром А (ЭХА) используется в качестве субстанции для производства лекарственных препаратов серии «Гистохром», применяемых в кардиологии и офтальмологии, а также для производства БАД к пище «Тимарин», «Хитохром», «Золотой рог». Они предназначены для профилактики атеросклероза, коронарной болезни сердца, улучшения липидного статуса крови, обеспечения антиоксидантной защиты организма [RU 2134107, RU 2137472, RU 2137400, RU 2340216, RU 2337696, RU 2360683, RU 2359686].

Активность ЭХА в организме обусловлена улучшением снабжения периферийных тканей кислородом вследствие биологических реакций, как с самими клетками, так и с отдельными ферментными системами.

Сырьем для производства ЭХА являются плоские морские ежи вида *Scaphechinus mirabilis*, широко распространенные у дальневосточного побережья Японского моря.

Производство ЭХА представляет технологический процесс с использованием органических растворителей, таких как хлороформ, гексан, ацетон, диоксан, не разрешенных для применения в пищевой промышленности. Для удаления токсичных растворителей используют вакуум-сублимацию при температуре 220-222°C, трудоемкую и энергоемкую. Такие приемы обусловлены необходимостью получения высокоочищенного индивидуального вещества, используемого в качестве субстанции для приготовления лекарственных препаратов для инъекций. Кроме этого, эхинохром А растворим в спирте и нерастворим в воде, что ограничивает область его применения в производстве БАД и ФПП.

Известен способ получения 2,3,5,7,8-пентагидрокси-6-этил-1,4-нафтохинона (эхинохрома А) путем экстракции морских ежей раствором неорганической кислоты в органическом растворителе, жидкостной экстракции хлороформом и перекристаллизации из органического растворителя, например, диоксана, с последующей вакуум сублимацией при 220°C [RU 2283298 C1, 22.05.2006].

Недостатками данного способа являются использование хлороформа и диоксана, не разрешенных для применения в пищевой промышленности, а также энергозатратный и трудоемкий процесс возгонки целевого продукта. Способ разработан для получения ЭХА - субстанции лекарственных препаратов серии «Гистохром».

В качестве прототипа выбран способ получения 2,3,5,7,8-пентагидрокси-6-этил-1,4-нафтохинона из консервированных морских ежей, включающий декантацию консерванта, экстракцию сырья этиловым спиртом с добавлением неорганической кислоты, хроматографию экстракта на колонке с хитозаном, элюирование целевого продукта 96% этанолом с добавлением соляной кислоты, нейтрализацию пищевой содой, упаривание с последующим перерастворением в хлороформе или ацетоне и перекристаллизацию из этанола [RU 2352554 C1, 20.04.2009].

Недостатком данного способа является хроматографическая очистка целевого продукта на хитозане. Процесс является трудоемким, длительным и требует упаривания больших объемов растворителей. ЭХА, получаемый этим способом, непригоден для использования в качестве ингредиента БАД к пище и ФПП, т.к. нерастворим в воде и получен с применением токсичных растворителей. В способе используется дополнительная очистка целевого продукта путем его перерастворения в хлороформе

и перекристаллизации. При этом получают высокоочищенную дорогостоящую субстанцию для лекарственных препаратов, использование которой в пищевой промышленности экономически нецелесообразно.

Поскольку БАД и ФПП используются в качестве нутриентных форм, то в этой связи возникла необходимость разработки способа получения водорастворимой формы ЭХА при сохранении его функциональных свойств с использованием разрешенных к использованию в пищевой промышленности экстракционных растворителей и технологических материалов. Этим требованиям отвечает моонатриевая соль ЭХА. При попадании в желудочно-кишечный тракт в кислой среде моонатриевая соль ЭХА переходит в активную форму, пригодную для усвоения.

Техническим результатом, обеспечиваемым изобретением, является разработка способа получения водорастворимой формы эхинохрома А из плоских морских ежей в виде его моонатриевой соли, без потери функциональных свойств, присущих эхинохрому А, пригодной для использования в фармакологической, и пищевой промышленности в составе БАД и ФПП.

Заявляемый способ менее трудоемок, т.к. не требует упаривания больших объемов токсичных растворителей, в процессе производства используются только разрешенные для пищевых производств материалы и растворители, такие как вода питьевая, спирт этиловый, кислота аскорбиновая, кислота фосфорная, сода пищевая. Сущность разработанного способа состоит в следующем.

Плоских морских ежей вида *Scaphechinus mirabilis*, свежельвовленных или дефростированных, промывают питьевой водой для удаления посторонних примесей (морских солей и песка) и подсушивают на воздухе. Затем сырье экстрагируют 96% этиловым спиртом с добавлением аскорбиновой кислоты при соотношении сырье : этиловый спирт : аскорбиновая кислота 1:(1,0-1,2):(0,003-0,005) (кг : л : кг) в течение 22-26 ч при комнатной температуре. Экстракция свежельвовленного или дефростированного сырья этиловым спиртом с аскорбиновой кислотой обусловлена необходимостью обезжиривания сырья с целью удаления липидов. Добавление аскорбиновой кислоты предотвращает окисление ЭХА и, соответственно, потери целевого продукта. Экстракт сливают, спирт этиловый отгоняют и отправляют на регенерацию. Концентрированный остаток, содержащий небольшое количество пигментов, разбавляют дистиллированной водой и пропускают через колонку с гидрофобным сорбентом Полихром 1, чтобы избежать потери ЭХА.

Подготовленное сырье экстрагируют 96% этиловым спиртом с добавлением фосфорной кислоты в соотношении сырье : этиловый спирт : фосфорная кислота 1:(1,0-1,2):(0,002-0,005) (кг : л : кг). Экстракцию проводят двукратно при комнатной температуре в течение 22-26 ч. Полученные экстракты сливают, объединяют и упаривают. Спиртовый отгон отправляют на регенерацию и повторное использование. Сухой остаток промывают дистиллированной водой. Пигментные фракции с полихрома 1 элюируют 40% этиловым спиртом. Элюат упаривают досуха, спирт отправляют на регенерацию.

Сухой остаток, полученный на стадии экстракции, объединяют с концентратом элюата и промывают дистиллированной водой. Промытый концентрированный остаток, содержащий эхинохром А, растворяют в 1,0% водном растворе бикарбоната натрия в соотношении концентрированный остаток : содовый раствор 1:(1,5-2,0) (кг : л).

Полученный раствор центрифугируют. Осадок, содержащий липиды, отбрасывают. Водный раствор, содержащий моонатриевую соль эхинохрома А, высушивают на лиофильной или распылительной сушилке. Получают красновато-бурый сыпучий

порошок, содержащий 83-85% моноватриевой соли эхинохрома А, хорошо растворимой в воде, без потери функциональных свойств, присущих ЭХА.

Анализ содержания моноватриевой соли ЭХА в целевом продукте осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе LaChrom (Hitachi Merck), снабженным УФ детектором L-7400, термостатом L-7300, насосом L-7100, интегратором D-7500. Для анализа использовали колонку ZORBAX Eclipse XDB-C18(Agilent) 4.6×75 mm, 3.5 μm. Детектирование проводили при λ=210 нм, скорость подачи растворителей 0,9 мл/мин, температура термостата 30°C. Элюцию проводили смесью растворителей А (ацетонитрил + 1% CH<sub>3</sub>COOH), В (вода + 1% CH<sub>3</sub>COOH); градиент (10% А + 90% В)→(90% А + 10% В). При подкислении раствора моноватриевой соли ЭХА происходит образование ацетата натрия и ЭХА.

Для определения подлинности целевого продукта был проведен сравнительный анализ спектров поглощения моноватриевой соли ЭХА и фармакопейного ЭХА. Анализ осуществляли методом спектрофотометрии в УФ и видимом диапазонах на спектрофотометре СФ-200 (ОКБ «Спектр», г. Санкт-Петербург, Россия). Использованы кварцевые кюветы с толщиной слоя 1 см. В качестве вещества сравнения использован фармакопейный эхинохром А с чистотой 98%.

На фиг. 1 представлена ВЭЖХ хроматограмма моноватриевой соли ЭХА с чистотой 85%. Полученный спектр ВЭЖХ имеет полосу поглощения при λ 270 нм, соответствующую времени удерживания 15.55 мин, что характерно для ЭХА в данной системе растворителей.

На фиг. 2 представлена ВЭЖХ хроматограмма подкисленного спиртового раствора фармакопейного ЭХА с чистотой 98%, используемого в качестве стандартного образца. Полоса поглощения фармакопейного ЭХА при λ 270 нм соответствует времени удерживания 15.55 мин (для данной системы растворителей).

На фиг. 3 представлен УФ-видимый спектр поглощения спиртового раствора полученной моноватриевой соли ЭХА, подкисленного соляной кислотой для превращения моноватриевой соли ЭХА в эхинохром А (ось абсцисс - длина волны λ (нм), ось ординат - оптическая плотность в относительных единицах).

На фиг. 4 представлен УФ-видимый спектр поглощения подкисленного спиртового раствора фармакопейного эхинохрома А, используемого в качестве стандарта (ось абсцисс - длина волны λ (нм), ось ординат - оптическая плотность в относительных единицах).

УФ-видимый спектр поглощения спиртового раствора полученной моноватриевой соли ЭХА (фиг. 3) имеет максимумы поглощения, идентичные стандартному образцу, представленному на фиг. 4. Наличие хорошо выраженных максимумов поглощения свидетельствуют о высокой степени чистоты образца препарата.

Изобретение иллюстрируется примерами.

Пример 1.

Сырье - 100 кг плоских морских ежей вида *Scaphechinus mirabilis*, свежельвовленных или дефростированных, промывают питьевой водой для удаления морских солей, песка и других посторонних примесей. Промытое сырье подсушивают на воздухе, помещают в реактор и заливают 100 л 96% этилового спирта с добавлением 0,3 кг аскорбиновой кислоты «под зеркало». Время настаивания 22 ч при комнатной температуре. Полученный экстракт сливают и упаривают. Спирт этиловый отправляют на регенерацию.

Концентрированный остаток, содержащий небольшое количество пигментов, разбавляют 5 л дистиллированной воды и пропускают через хроматографическую

колонку с полихромом 1. Пигментную фракцию элюируют 40% водным раствором этилового спирта. Элюат упаривают досуха. Спирт этиловый отправляют на регенерацию.

5 Сырье подсушивают на воздухе и экстрагируют 100 л 96% этилового спирта с добавлением 0,2 кг фосфорной кислоты. Экстракцию проводят двукратно при комнатной температуре в течение 22 ч. Полученные экстракты сливают, объединяют и упаривают. Отгон этилового спирта отправляют на регенерацию. Сухой остаток промывают дистиллированной водой. Пигментные фракции с полихрома 1 элюируют 40% этиловым спиртом. Элюат упаривают досуха.

10 Сухой остаток, полученный на стадии экстракции в количестве 1 кг, объединяют с концентратом элюата в количестве 0,01 кг и промывают дистиллированной водой.

Промытый концентрированный остаток растворяют в 1,5 л 1,0% водного раствора бикарбоната натрия. Полученный раствор центрифугируют. Осадок, содержащий липиды, отбрасывают. Водный раствор моноватриевой соли эхинохрома А высушивают на лиофильной сушилке. Получают 0,058 кг красновато-бурого сыпучего порошка, содержащего 83% моноватриевой соли эхинохрома А.

#### Пример 2.

Сырье - 100 кг плоских морских ежей вида *Scaphechinus mirabilis*, свежевывловленных или дефростированных, промывают питьевой водой для удаления морских солей, песка и других посторонних примесей. Промытое сырье подсушивают на воздухе, помещают в реактор и заливают 100 л 96% этилового спирта с добавлением 0,5 кг аскорбиновой кислоты «под зеркало». Время настаивания 26 ч при комнатной температуре. Полученный экстракт сливают и упаривают. Спирт этиловый отправляют на регенерацию.

25 Концентрированный остаток, содержащий небольшое количество пигментов, разбавляют 5 л дистиллированной воды и пропускают через хроматографическую колонку с полихромом 1. Пигментную фракцию элюируют 40% водным раствором этилового спирта. Элюат упаривают досуха. Спирт этиловый отправляют на регенерацию.

30 Сырье подсушивают на воздухе и экстрагируют 100 л 96% этилового спирта с добавлением 0,5 кг фосфорной кислоты. Экстракцию проводят двукратно при комнатной температуре в течение 26 ч. Полученные экстракты сливают, объединяют и упаривают. Отгон этилового спирта отправляют на регенерацию. Сухой остаток промывают дистиллированной водой. Пигментные фракции с полихрома 1 элюируют 40% этиловым спиртом. Элюат упаривают досуха.

35 Сухой остаток, полученный на стадии экстракции в количестве 1 кг, объединяют с концентратом элюата в количестве 0,01 кг и промывают дистиллированной водой.

Промытый концентрированный остаток растворяют в 2,0 л 1,0% водного раствора бикарбоната натрия. Полученный раствор центрифугируют. Осадок, содержащий липиды, отбрасывают. Водный раствор моноватриевой соли эхинохрома А высушивают на лиофильной сушилке. Получают 0,060 кг красновато-бурого сыпучего порошка, содержащего 85% моноватриевой соли эхинохрома А.

#### (57) Формула изобретения

45 Способ получения водорастворимой моноватриевой соли эхинохрома А из плоских морских ежей, пригодной для использования в фармакологической и пищевой промышленности, характеризующийся тем, что свежевывловленное или дефростированное сырье предварительно промывают питьевой водой, подсушивают,



заливают 96% этиловым спиртом с добавлением аскорбиновой кислоты при соотношении сырье : этиловый спирт : аскорбиновая кислота 1:(1,0-1,2):(0,003-0,005) (кг : л : кг) и экстрагируют при комнатной температуре в течение 22-26 ч, затем полученный экстракт сливают и упаривают, далее концентрированный остаток  
5 разбавляют дистиллированной водой и пропускают через колонку с полихромом 1, затем пигментные фракции элюируют 40% этиловым спиртом, элюат упаривают досуха, далее обезжиренное сырье подвергают двукратной экстракции 96% этиловым спиртом с добавлением фосфорной кислоты при комнатной температуре в соотношении сырье : этиловый спирт : фосфорная кислота 1:(1,0-1,2):(0,002-0,005) (кг : л : кг) в течение 22-  
10 26 ч, затем полученные экстракты сливают, объединяют и упаривают, а сухой остаток, полученный на стадии экстракции, объединяют с концентратом элюата и промывают дистиллированной водой, далее концентрат растворяют в 1,0% водном растворе бикарбоната натрия в соотношении концентрированный остаток : содовый раствор 1:  
15 (1,5-2,0) (кг : л), затем полученный раствор центрифугируют, осадок отбрасывают, а полученный водный раствор, содержащий моносодовую соль эхинохрома А, высушивают на лиофильной или распылительной сушилке с получением целевого продукта.

20

25

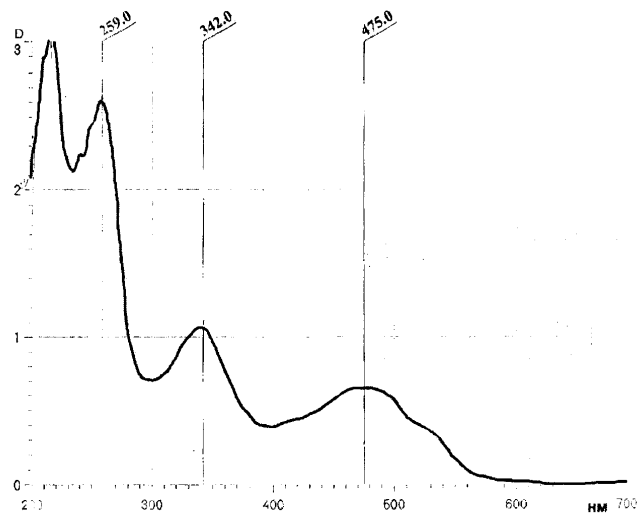
30

35

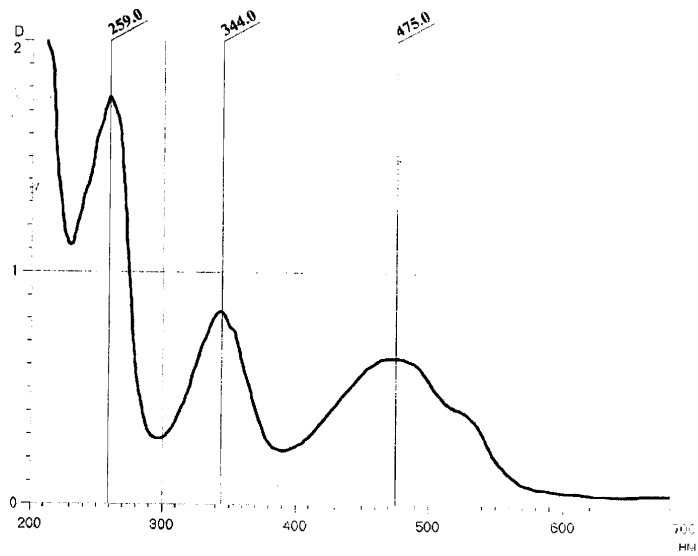
40

45

1

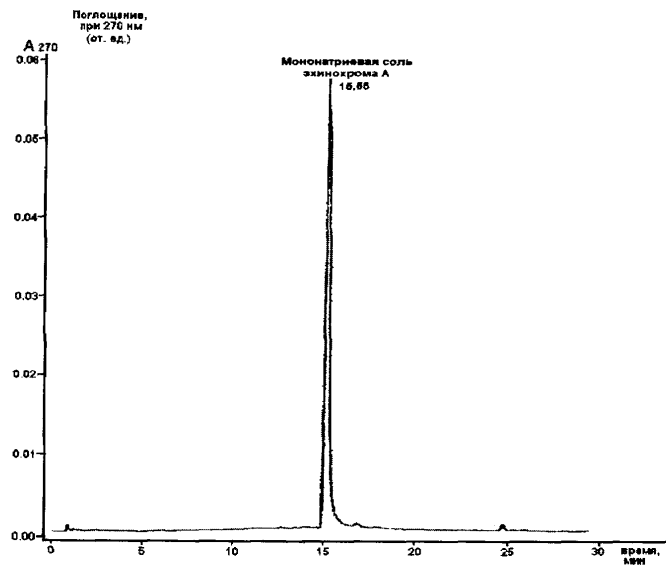


Фиг. 3

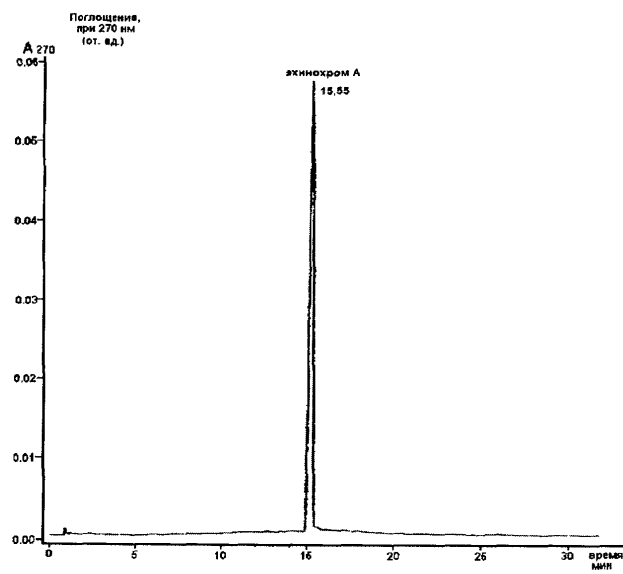


Фиг. 4

2



Фиг. 1



Фиг. 2