

А. С. Криштопина, И. Н. Уракова, О. Н. Пожарицкая, Е. В. Разбоева,
В. М. Косман, В. Г. Макаров, А. Н. Шиков

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ИЗВЛЕЧЕНИЯ ПОЛИГИДРОКСИНАФТОХИНОНА ИЗ ПАНЦИРЯ МОРСКИХ ЕЖЕЙ *STRONGYLOCENTROTUS DROEBACHIENSIS*

Санкт-Петербургский институт фармации, Россия, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г. п. Кузьмолловский, д. б/н, корп. 245; e-mail: spb.pharmacy@gmail.com

Изучен процесс экстракции липофильных веществ из панциря с иглами зеленого морского ежа. Установлено, что наибольшее влияние на выход липофильных веществ оказывает время экстракции, в то время как температура и модуль экстракции оказывают незначительное влияние. В качестве экстрагента, извлекающего максимальное количество липофильных веществ, выбран 95 % этиловый спирт. В результате оптимизации процесса обезжиривания установлено, что максимальный выход липофильных веществ (1,2 %) достигим при обработке сырья в течение 3 ч, при температуре экстракции 55 °С и соотношении сырьё — экстрагент (1:8). В липофильном экстракте обнаружены 57 % свободных жирных кислот, около 7 % фосфолипидов, диглицериды, стерины, триглицериды и углеводороды. Фосфолипиды в липофильном экстракте представлены преимущественно фосфатидилхолином. Лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтанолламин, фосфатидилинозитол и фосфатидилэтанолламин обнаружены в следовых количествах. Содержание полигидроксиафтохинонового пигмента после очистки сырья от липофильных веществ по данным ВЭЖХ составило 98,5 %.

Ключевые слова: липиды; экстракция; *Strongylocentrotus droebachiensis*; оптимизация; полигидроксиафтохинон.

Некоторые биологически активные вещества (БАВ), выделенные из морских животных, водорослей и бактерий, обладают высокой фармакологической активностью [1]. Морские ежи — донные животные, обитающие практически во всех морях и океанах (за исключением слабосоленых), относятся к классу иглокожих *Echinoidea*. Некоторые виды морских ежей являются промысловыми. В качестве пищевого продукта используют в основном их гонады, масса которых составляет примерно 10 % от массы ежа. Экстракты из гонад морских ежей проявляют противовоспалительные и антидиабетические свойства [2]. Отходы промышленной переработки (панцири и иглы) могут служить богатым источником уникальных БАВ [3]. Панцирь представляет собой известковое образование. Различную окраску панциря придают пигменты — производные нафтохинона. Общее содержание полигидроксилированных 1,4-нафтохиноновых пигментов (ПГНФП) в панцире составляет 121 – 163 мг/г [4]. От нафтохинонов других морских животных они отличаются присутствием в молекуле хинона большого числа свободных гидроксильных групп и, вследствие этого, ярко выраженными антиоксидантными свойствами [5]. На основе эхинохрома А, первоначально выделенного из плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, разработан препарат Гистохром, обладающий противомикробным, кардиопротекторным и антиоксидантным действием [6]. Спинохромы В и Д и димеры на их основе проявляют антирадикальные [7], антиаллергические [8] и антидиабетические свойства [9].

В связи с этим актуальной является разработка оптимальной технологии выделения индивидуального димерного ПГНФП из панцирей зеленых морских ежей. Предварительные эксперименты показали, что экстракт, получаемый деминерализацией нативного

панциря, содержит значительное количество липидных примесей, которые оказывают негативное влияние на стабильность пигмента. Целью данной работы являлась оптимизация технологического процесса извлечения ПГНФП из панциря морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* путем удаления побочных примесей липидного характера и повышения чистоты конечного продукта.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали панцири и иглы зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis*, выловленных в Баренцевом море в 2015 г. После разделки ежей панцири промывали проточной водой для удаления остатков внутренних органов, сушили на воздухе в течение 1 сут, измельчали и использовали для дальнейших исследований.

Экстракция липофильных веществ. 20 г сухого измельченного панциря с иглами заливали 160 мл экстрагента, в качестве которого использовали растворители различной полярности (95 % этанол, 2-пропанол, ацетон, гексан), перемешивали и оставляли для экстракции на 3 ч при комнатной температуре. По окончании экстракции экстрагент собирали, концентрировали под вакуумом на роторном испарителе и досушивали до постоянной массы. Выход липофильных веществ оценивали гравиметрически. Остаток панциря сушили на воздухе при комнатной температуре и направляли на дальнейшее выделение ПГНФП.

Содержание суммы свободных жирных кислот в пересчете на олеиновую кислоту определяли титриметрически [10].

Содержание суммы фосфолипидов в пересчете на фосфатидилхолин определяли спектрофотометриче-

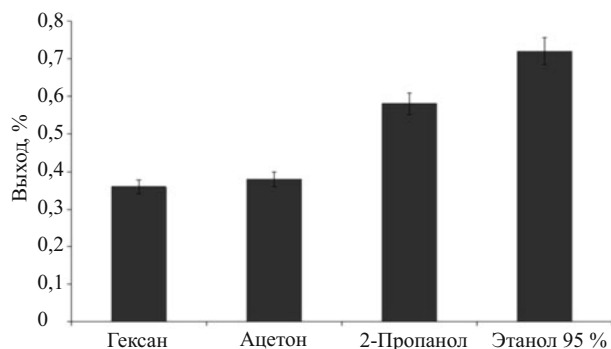


Рис. 1. Влияние полярности растворителя на выход липофильных веществ.

ски по реакции с ферроотиоцианатом аммония [11] на спектрофотометре UV-1700 (Shimadzu, Япония) при длине волны 475 нм, используя в качестве стандарта фосфатидилхолин (Sigma, США).

Качественный состав липидов определяли методом ТСХ на пластинах Silicagel 60F254 (Merck, Германия) в следующих системах растворителей: петролейный эфир — диэтиловый эфир — уксусная кислота (8/2/0,1; об./об.) для анализа нейтральных липидов [12] и хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода (7/2/0,8/0,5; об./об) для анализа фосфолипидов [13]. Растворы испытуемых веществ готовили в смеси хлороформ — метанол (2/1; об./об.) в концентрации 20 мг/мл; стандартных образцов — в метаноле в концентрации 1 мг/мл.

Для визуализации пластины погружали в 2 % раствор фосфорномолибденовой кислоты в метаноле на 5 с, высушивали в горизонтальном положении до удаления с поверхности избытка растворителя и нагревали на нагревательной панели TLC Plate Heater при 120 °С. Детектирование осуществляли с использованием сканирующего спектроденситометра TLC Scanner 3 (Camag, Швейцария). Содержание идентифицированных соединений рассчитывали методом внутренней нормализации.

Чистоту ПГНФП оценивали методом ВЭЖХ на хроматографе высокого давления с диодно-матричным детектором в линейном градиентном режиме элюирования смесью 0,03 % раствора трифторуксусной кислоты и ацетонитрила, скорость подачи элюента 1,0 мл/мин, объем проб 20 мкл, длина волны детектирования 330 нм. Регистрация и обработка хроматограмм выполнена с помощью программного обеспече-

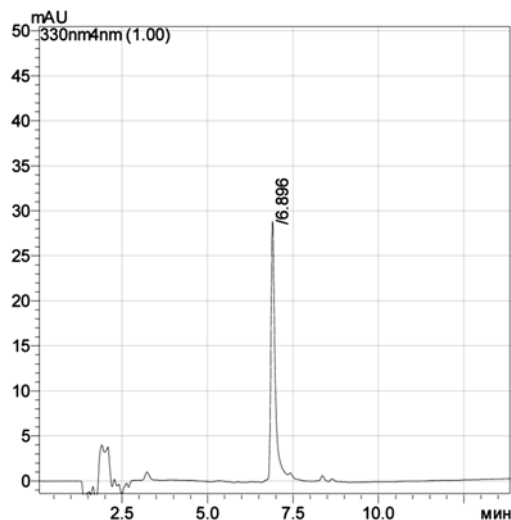


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограмма димерного полигидроксиафтохинона

ния LabSolution (Shimadzu, Япония). Содержание ПГНФП оценивали методом внутренней нормализации [14].

Оптимизацию процесса экстракции липофильных веществ проводили с помощью метода математического планирования по плану Бокса — Уилсона. Для проверки значимости влияния факторов, оптимизацию проводили с использованием дробной реплики (1/4) с двумя уровнями 5 переменных. В качестве независимых переменных выбраны следующие факторы: X1 — степень измельчения (фракция, проходящие через сито с соответствующим диаметром отверстий), мм; X2 — продолжительность экстракции, ч; X3 — воздействие ультразвука; X4 — температурный режим, t °С; X5 — соотношение сырья и экстрагента (модуль экстракции). Выход процесса (Y), определен как выход липофильных веществ (процент от навески сырья). Основные факторы и уровни их варьирования представлены в табл. 1.

Регрессионный мультифакторный анализ полученных результатов проводили с помощью программы Statgraphics 5.0 (Statpoint Technologies, Inc., США).

Таблица 2

План и результаты факторного эксперимента по оптимизации процесса получения липофильных веществ из панциря и игл морского ежа *St. droebachiensis*

Таблица 1
Основные переменные факторы эксперимента и уровни их варьирования для экстракции липофильных веществ из панциря и игл морского ежа *St. droebachiensis*

Характеристика плана	Переменные факторы				
	X1	X2	X3	X4	X5
Основной уровень (X0)	6	2	0	40	5,5
Шаг варьирования	4	1	0	15	2,5
Верхний уровень, X (+)	≥ 10	3	+	55	8
Нижний уровень, X (-)	≤ 2	1	-	25	3

Опыт	Фактор эксперимента					Выход липофильных веществ (Mean ± s.d.)
	X1, мм	X2, ч	X3, ультразвук	X4, °С	X5, модуль	
1	10	3	+	55	1:8	0,86 ± 0,02
2	2	1	+	55	1:8	1,08 ± 0,01
3	2	3	+	25	1:3	0,79 ± 0,01
4	10	1	+	25	1:3	0,64 ± 0,03
5	10	3	-	25	1:8	0,94 ± 0,03
6	2	1	-	25	1:8	0,85 ± 0,01
7	2	3	-	55	1:3	0,85 ± 0,01
8	10	1	-	55	1:3	0,74 ± 0,03

$$Y = 0,0769X_2 + 0,0080X_4 + 0,0062X_5.$$

Первоначально изучили влияние полярности растворителя на выход липофильных веществ (рис. 1).

Установлено, что неполярный растворитель (гексан) извлекает из панциря морских ежей наименьшее количество липофильных веществ (около 0,35 %), в то время как применение полярных растворителей (2-пропанол, 95 % этанол) приводит к повышению выхода липофильных веществ (до 0,7 – 0,9 %). Эффективность экстракции липидов в значительной степени зависит от химической природы липофильных веществ и от вида комплексов, которые образуют липиды в этой системе. Полярные растворители разрушают водородные связи и ослабляют электростатическое взаимодействие липидов с белками, что способствует наиболее эффективному экстрагированию липидов [15]. Из данных, представленных на рис. 1, следует, что максимальной экстрагирующей способностью для оцениваемой системы обладает 95 % этанол. Этот растворитель позволил извлечь максимальное количество липофильных веществ, поэтому он выбран для дальнейших экспериментов.

Задача оптимизации сводилась к определению технологических параметров, обеспечивающих максимальный выход липофильных веществ. Результаты реализации матрицы планирования эксперимента представлены в табл. 2.

После статистической обработки данных факторного эксперимента получено линейное уравнение регрессии в реальных единицах:

Таблица 3
Состав липофильных веществ липидного экстракта, оценённый в условиях анализа нейтральных липидов

№ пятна	Класс липидов	R_f	Содержание, %	Вид пластины, полученной при изучении липидных веществ в условиях анализа нейтральных липидов
8	Сквален, углеводороды (парафины и олефины)	0,92	0,65	
7	Эфиры стеринов, эфиры восков	0,88	2,74 ± 0,23	
6	Триглицериды	0,47	1,14 ± 0,08	
5	Жирные кислоты	0,21	40,14 ± 3,88	
4	Стерины	0,14	9,62 ± 0,95	
3	1,3-Диглицериды, 1,2-Диглицериды	0,09	10,54 ± 1,01	
2	1-О-Моноалкиловые эфиры глицерина	0,04	23,72 ± 2,21	
1	Моноглицериды	0,01	11,46 ± 1,12	

а) испытуемый раствор, б) раствор стандарта α -токоферола

Модель информационно способна и значима по критерию Фишера ($F_{\text{эсп}} = 56,60 > F_{\text{табл}} = 4,9$). Коэффициент детерминации параметра Y составил 97,14 %, уровень значимости $p = 0,0003$.

Проверка значимости коэффициентов данных уравнений по t -критерию Стьюдента при достоверной вероятности 0,95 показала, что коэффициенты X_1 и X_3 статистически не значимы для уравнения (Y), т.е. степень измельчения и воздействие ультразвука значимо не влияли на выход липофильных веществ.

Уравнение дает представление о количественном влиянии каждого значимого фактора на выход липофильных веществ. Методом дисперсионного анализа установлено, что наибольшее влияние на выход липофильных веществ оказывало время экстракции (фактор X_2), в то время влияние температуры (X_4) и модуля экстракции (X_5) было не столь существенным.

Интересным оказался факт отсутствия влияния степени измельчения сырья (X_1) на выход липофильных веществ. Это, вероятно, связано с тем, что липофильные вещества в панцире способны накапливаться лишь в пленке, выстилающей его внутреннюю часть [16], вследствие чего для экстракции липидов доступен лишь тонкий слой внутренней поверхности панциря. Измельчение сырья в таком случае не влияет на увеличение площади поверхности контакта с экстрагентом, необходимой для достижения полноты экстракции, что и обнаружено в эксперименте.

Отсутствие влияния еще одного технологического параметра — воздействие ультразвука (фактор X_3) — также может быть связано с указанной особенностью строения панциря морского ежа.

Таблица 4
Состав липофильных веществ липидного экстракта, оценённый в условиях анализа фосфолипидов

№ пятна	Класс липидов	R_f	Содержание, %	Вид пластины, полученной при изучении липидных веществ в условиях анализа фосфолипидов
7	Нейтральные липиды	0,95 – 1,00	1,36 ± 0,11	
6	Цереброзид	0,83	3,10 ± 0,31	
5	Фосфатидилэтанолламин	0,56	16,59 ± 1,68	
4	Фосфатидилинозитол	0,46	14,55 ± 1,42	
3	Фосфатидилхолин	0,36	36,45 ± 3,62	
2	Лизофосфатидилэтанолламин	0,29	10,48 ± 1,02	
1	Лизофосфатидилхолин	0,16	17,47 ± 1,72	

а) испытуемый раствор, б) раствор стандарта лизофосфатидилхолина

В результате процедуры крутого восхождения для установления оптимальных условий процесса установлено, что максимальный выход липофильных веществ достижим при обработке сырья в течение 3 ч, температуре экстракции 55 °С и соотношении сырья – экстрагент (1:8). В этих условиях получен экстракт липофильных веществ с выходом около 1,2 %. Сравнение экспериментальных данных по выходу липофильных веществ из панциря с литературными 0,76 % [4] позволяет сделать вывод, что экстракция в оптимизированных условиях приводит к более полному извлечению липидов из панциря.

Наработанный в оптимизированных условиях липофильный экстракт содержал около 57 % свободных жирных кислот и около 7 % фосфолипидов. Методом ТСХ в липидном экстракте идентифицированы соединения класса нейтральных липидов (табл. 3) и фосфолипидов (табл. 4). Идентификацию индивидуальных соединений или групп проводили на основании данных литературы [12 – 15].

Липидный состав гонад морских ежей представлен фосфолипидами, холестерином, лецитином, свободными жирными кислотами, ди- и триглицеридами и эфирами стероидов [2, 12].

При изучении липидного экстракта из панцирей и игл в условиях анализа нейтральных липидов в образце идентифицированы преимущественно свободные жирные кислоты. В следовых количествах идентифицированы стероиды, триглицериды и диглицериды, углеводороды. Исследование липидного экстракта показало наличие в нем фосфатидилхолина, фосфатидилэтанолamina, лизофосфатидилхолина и лизофосфатидилэтанолamina. Доминирующим компонентом является фосфатидилхолин.

После очистки сырья от липофильных веществ осуществлен гидролиз обезжиренного панциря и наработана серия пигмента, характеризующаяся по данным ВЭЖХ высокой чистотой индивидуального димерного полигидроксинафтохинона — 98,5 % (рис. 2).

Таким образом, разработан оптимизированный процесс выделения очищенного димерного полигидроксинафтохинона и найдены оптимальные условия вы-

деления липофильных веществ. Пигмент, полученный после очистки сырья от липофильных веществ, характеризуется по данным ВЭЖХ высокой чистотой — 98,5 %.

Работа выполнена при финансовой поддержке и в рамках государственного контракта ГК № 14411.2049999.19.052 “Доклинические исследования лекарственного средства на основе биснафтазарина для лечения аллергических и воспалительных заболеваний глаз”.

ЛИТЕРАТУРА

1. K. B. Glaser and A. M. Mayer, *Biochem. Pharmacol.*, **78**(5), 440 – 448 (2009).
2. O. N. Pozharitskaya, A. N. Shikov, I. Laakso, et al., *J. Funct. Foods*, **17**, 227 – 234 (2015).
3. Т. А. Рущкова, А. А. Артюков, Е. В. Купера и др., *Вестник ДВО РАН*, № 1, 174 – 183 (2014).
4. R. Amarowicz, J. Synowiecki, F. Shahidi, *Food Chem.*, **133**(3), 822 – 826 (2012).
5. R. Kuwahara, H. Hatate, T. Yuki, et al., *LWT-Food Sci. Technol.*, **42**(7), 1296 – 1300 (2009).
6. Н. П. Мищенко, С. А. Федорев, В. Л. Багирова, *Хим.-фарм. журн.*, **37**(1), 49 – 53 (2003); *Pharm. Chem. J.*, **37**(1), 48 – 52 (2003).
7. O. N. Pozharitskaya, S. A. Ivanova, A. N. Shikov, V. G. Makarov, *Chromatographia*, **76**(19 – 20), 1353 – 1358 (2013).
8. O. N. Pozharitskaya, A. N. Shikov, M. N. Makarova, et al., *Planta Med.*, **79**(18), 1698 – 1704 (2013).
9. М. А. Ковалева, С. А. Иванова, М. Н. Макарова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **76**(8), 27 – 30 (2013).
10. P. J. Ke A. D. Woyewoda, *Anal. Chim. Acta*, **99**(2), 387 – 391 (1978).
11. J. C. M. Stewart, *Anal. Biochem.*, **104**(1), 10 – 14 (1980).
12. A. N. Shikov, I. Laakso, O. N. Pozharitskaya, et al., *Planta Med.*, **77**(12), 1357 – 1358 (2011).
13. S. A. Ivanova, I. N. Urakova, O. N. Pozharitskaya, et al., *Planta Med.*, **76**(12), 1333 (2010).
14. A. N. Shikov, V. I. Ossipov, O. Martiskainen, et al., *J. Chromatogr. A*, **1218**(50), 9111 – 9114 (2011).
15. М. А. Сысоева, В. Р. Хабибрахманова, В. С. Гамаюрова, А. Х. Тазеева, *Химия растит. сырья*, № 3, 119 – 122 (2008).
16. A. C. Giese, *Physiol. Rev.*, **46**(2), 244 – 298 (1966).

Поступила 26.04.16

OPTIMIZATION OF POLY(HYDROXYNAPHTHOQUINONE) EXTRACTION FROM SHELLS OF *STRONGYLOCENTROTUS DROEBACHIENSIS* SEA URCHINS

A. S. Krishtopina*, I. N. Urakova, O. N. Pozharitskaya, E. V. Razboeva, V. M. Kosman, V. G. Makarov, and A. N. Shikov

St. Petersburg Institute of Pharmacy, Kuzmolovo, Vsevolozhsk district, Leningrad oblast, 188663 Russia

* e-mail: spb.pharmacy@gmail.com

The process of defatting of the shell and spines of green sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*) has been studied. It was found that the extraction time was the most important factor determining the yield of lipophilic substances, while the temperature and extraction modulus did not significantly influence the yield of lipid compounds. Ethanol was chosen as optimum solvent for the extraction of lipophilic substances. As result of optimization of the extraction process, it was found that maximum yield (1.2%) of lipophilic substances from raw materials was achieved for 3 h at a temperature of 55°C, and the optimum ratio of raw material to ethanol was 1 : 8 (v/v). About 57% free fatty acids, 7% of phospholipids, as well as diglycerides, sterols, triglycerides, and hydrocarbons were found in the lipophilic extract. Phospholipids were represented mainly by phosphatidylcholine, while lysophosphatidylcholine, lysophosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, and phosphatidylethanolamine were extracted in trace amounts. The content of poly(hydroxynaphthoquinone) pigment after removal of lipophilic impurities amounted to 98.5% as evidenced by HPLC.

Keywords: lipids; extraction; *Strongylocentrotus droebachiensis*; optimization; poly(hydroxynaphthoquinone).