

ПОЛУЧЕНИЕ ОЛЕАНОЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОЛИЗОМ АРАЛОЗИДОВ АРАЛИИ МАНЬЧЖУРСКОЙ В СУБКРИТИЧЕСКОЙ ВОДЕ

О. В. Филонова, А. В. Лекарь, С. Н. Борисенко, Е. В. Ветрова,
Е. В. Максименко, Н. И. Борисенко*, В. И. Минкин

Научно-исследовательский институт физической и органической химии Южного
федерального университета (ЮФУ), Ростов-на-Дону, Россия

*boni@i.poc.rsu.ru

Поступила в редакцию 26.01.2015 г.

Разработана методика получения олеаноловой кислоты (ОК) и ее производных гидролизом аралозидов аралии маньчжурской в среде субкритической воды, реализованная на примере обработки фармпрепарата «Сапарал» при 120–240 °С в статическом режиме. Максимальный выход ОК достигается при 210 °С.

Ключевые слова: субкритическая вода, аралозиды, аралия маньчжурская, сапонины, сапарал, олеаноловая кислота, ВЭЖХ-МС.

ВВЕДЕНИЕ

Тритерпеновые гликозиды остаются классическими объектами исследования современной медицинской химии благодаря широкому спектру их биологической активности. Типичным примером таких гликозидов служат аралозиды [1] **А**, **В** и **С** — биологически активные вещества, извлекаемые из корней аралии маньчжурской (*Aralia mandshurica Rupr.*) и представляющие собой гликозиды олеаноловой кислоты (ОК) (рис. 1). Растительные метаболиты на основе аралозидов широко используются в фармацевтической практике. В РФ исходным продуктом для лекарственных средств на основе аралии маньчжурской является препарат

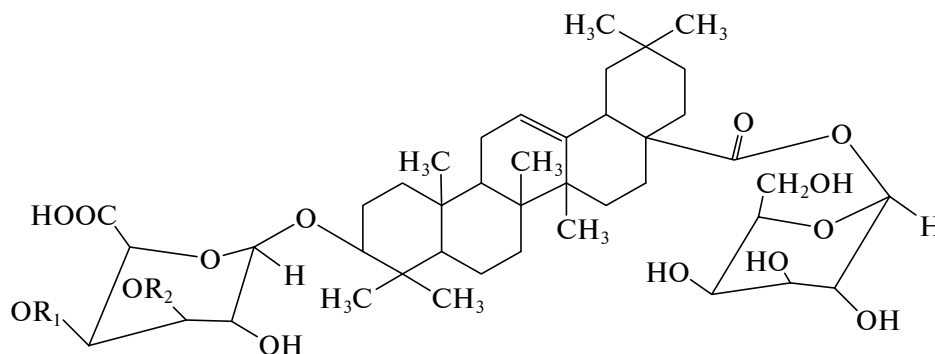


Рис. 1. Структурная формула аралозидов: **А** ($R_1 = L$ -арабиноза, $R_2 = H$); **В** ($R_1 = L$ -арабиноза, $R_2 = L$ -арабиноза); **С** ($R_1 = D$ -галактоза, $R_2 = D$ -ксилоза)

«Сапарал» (ГНУ ВИЛАР) — аморфный порошок кремового цвета с содержанием смеси аммониевых солей аралозидов **А**, **В** и **С** не менее 80 %.

Агликоном аралозидов аралии маньчжурской [2] является олеаноловая кислота, которая, как показывают многочисленные исследования последних лет, имеет широкий спектр активности, зачастую отличный от свойств исходных аралозидов. ОК относится к группе гетероциклических тритерпеноидов [3]. Тритерпеноиды структурно близки многим физиологически важным гормонам. Показано, что ОК обеспечивает расширение венозных сосудов сердца и питает сердечную мышцу [4]. Как и женьшень, препараты ОК тонизируют деятельность центральной нервной системы, повышают умственную работоспособность, регулируют процессы возбуждения и торможения в коре головного мозга, повышают устойчивость к стрессам [5]. ОК хорошо известна благодаря ее гепатопротекторным эффектам как при острых, так и химически индуцированных поражениях печени, хроническом фиброзе и циррозе печени [6, 7]. Предполагается, что воздействие этих тритерпеноидов на печень может быть обусловлено как их антиоксидантным и противовоспалительным действием, так и их специфическим воздействием на метаболизм.

Продемонстрировано [6, 7], что ОК может найти применение для ингибирования онкогенеза при химиотерапии на различных стадиях развития опухоли. Олеаноловая кислота и ее производные эффективны также при остром миелоидном лейкозе благодаря индукции апоптоза опухолевых клеток и ингибированию ангиогенеза путем вторжения в опухолевые клетки и метастазы [8, 9].

В природе производные ОК обычно встречаются в виде сапогенинов, которые в отличие от сапонинов не обладают гемолитической активностью и не токсичны для рыб [2]. Перечисленные свойства нашли применение при создании широкого спектра лекарственных форм.

Гликозиды гидролизуются кислотами и обычно стойки к действию щелочей. В растениях гликозиды легко разлагаются под влиянием особых ферментов — гликозидаз. Кислотно-катализируемый гидролиз О-гликозидов является общей реакцией подобных соединений. Классическая схема гидролиза включает применение в качестве растворителей и реагентов (в зависимости от метода) бензола, метанола, этанола, ледяной уксусной, концентрированной соляной, серной кислот [3, 10—12]. Скорость реакций варьируется в широких пределах и весьма чувствительна к структуре и стереохимии углеводного остатка, к структуре агликона и, разумеется, к кислотности среды и температуре. Диапазон типичных условий гидролиза охватывает температуры от комнатных до 120 °С и концентрации водных растворов кислот от 0,01 до 5 N, время реакции от 2 до 8 часов [13]. Изучение состава генинной части гидролизатов, полученных с использованием ледяной уксусной кислоты, показало, что все три аралозида (**А**, **В** и **С**) дают два вещества: одно идентично олеаноловой кислоте, другое — ее ацетату. При другом возможном варианте полного гидролиза аралозидов (соляной кислотой в метаноле) получается не только олеаноловая кислота, но и ее метиловый эфир [14]. Таким образом, использование традиционных методик получения олеаноловой кислоты требует как применения дорогостоящих и зачастую недружественных к окружающей среде органических растворителей, так и значительных временных затрат. Следует учитывать и необходимость последующей регенерации и утилизации немалого количества растворителей и кислот. Поэтому поиск новых методик получения субстанций, содержащих ОК и ее производные, на основе уже производимых в РФ субстанций, таких, например, как препарат «Сапарал» (ВИЛАР), является актуальной задачей.

В последнее десятилетие субкритическая вода (СБВ), находящаяся под давлением в температурном диапазоне 100—350 °С, широко используется в качестве реакционной среды для проведения экологически безопасного синтеза, катализируемого кислотами и щелочами [15—17]. В этой области температур и давлений кардинально меняются физико-химические свойства воды: диэлектрическая проницаемость, ионное произведение, вязкость, теплопроводность. При этом константа ионизации H_2O достигает максимального значения, которое на три порядка выше, чем в обычных условиях. Для получения специфического продукта реакции в среде СБВ могут быть подобраны оптимальные физико-химические параметры и условия, такие как температура, давление, время воздействия [18].

Цель представленной работы состояла в разработке методик получения субстанций на основе ОК из аралозидов сапарала путем гидролиза в среде СБВ. Методика, предлагаемая для получения субстанций на основе ОК и ее производных, базируется на подходе, ранее подробно описанном в работе авторов [19].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве исходного материала использован препарат «Сапарал» (ГНУ ВИЛАР). Количество аралозидов в исходном образце определялось по методикам ГФХ XI, т. 2, ст. 65 «Корни аралии маньчжурской» [20]. Для определения количества аралозидов количество ОК, образовавшейся в результате гидролиза, было пересчитано на аммонийные соли аралозидов (по средней величине молекулярного веса 1042,2 для суммы аммонийных солей аралозидов). Содержание аралозидов в использованном образце составило 59 %.

Традиционный гидролиз сапарала проводили по следующей методике [21]: навеску 10 мг растворяли в 10 мл смеси для гидролиза состава ледяная уксусная кислота — концентрированная (35—38 %) соляная кислота — вода в объемном соотношении 3,5 : 1 : 5,5 и кипятили в течение 2 часов. После охлаждения гидролизат разбавляли водой в 2 раза, выпавший осадок отделяли фильтрованием. Осадок на фильтре промывали водой, растворяли в горячем 96 % этаноле и собирали в мерной колбе на 25 мл. Полученный раствор анализировали на содержание ОК методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Гидролиз сапарала в СБВ выполнялся по методике, аналогичной описанной ранее в работе по получению агликона глицирризиновой кислоты из экстракта корня солодки [18]. Навеску препарата 0,050 г и 7 мл дистиллированной воды помещали в реактор из нержавеющей стали емкостью 10 мл, герметично закрывали и устанавливали в сушильный шкаф при заданной температуре от 120 до 240 °С (± 1 °С). По истечении заданного времени реактор охлаждали до комнатной температуры (в течение ~15 мин) в емкости с проточной холодной водой. Гидролизат фильтровали, остаток на фильтре промывали небольшим количеством воды. Осадок с фильтра растворяли в 96 % этаноле в мерной колбе на 25 мл и анализировали на содержание ОК методом ВЭЖХ.

Исследование методом ВЭЖХ выполнено на жидкостном хроматографе Agilent 1200. Условия хроматографирования: колонка Zorbax SB-C18 2,1 × 150 мм (зернище 3,5 мкм); подвижная фаза: элюент А — CH_3CN , элюент В — 0,01н H_2SO_4 ; режим элюирования: А : В — 10 : 90 (0 мин) → 60 : 40 (6 мин) → 80 : 20 (17—33 мин) → 10 : 90 (35—45 мин); температура колонки 28 °С; скорость элюента 0,14 мл/мин; UV-детектор (205 нм и 254 нм). Количественное определение ОК проводили по методу абсолютной калибровки. В качестве стандарта использовали

раствор олеаноловой кислоты (98 %, MP Biomedicals) в метаноле. Масс-спектры получены с использованием масс-спектрометра Bruker Daltonics micrOTOF-Q с ионизацией электрораспылением. Напряжение на капилляре распылителя ± 4000 В; параметры газа-осушителя (азот «ос.ч.», 7 л/мин, 200 °С) и энергия ионов на квадруполе (5,0 эВ) оптимизированы для детектирования пиков ионов. Идентификация продуктов реакции гидролиза сапарала выполнена также методами ЯМР и ИК. Инфракрасные спектры реакционных смесей сняты на приборе Varian 3100FT-IR Excaibur Series с использованием метода нарушенного полного внутреннего отражения. В качестве материала для призмы и кристалла использовали селенид цинка (ZnSe).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Представленный в данной работе способ гидролиза в субкритической воде может служить альтернативой классическому гидролизу сапонинов с применением токсичных органических растворителей (метанол и др.) и минеральных кислот. Наличие ОК в продуктах гидролиза было подтверждено методами ВЭЖХ-МС и ЯМР.

Масс-спектры гидролизата сапарала, полученного в СБВ, подтверждают наличие ОК в гидролизате присутствием пика депротонированного иона олеаноловой кислоты с m/z 455,354. Дополнительным доказательством наличия ОК в гидролизате является присутствие в масс-спектре пика со значением m/z 911,72, соответствующего депротонированному димеру олеаноловой кислоты.

По характеристикам ИК-спектров выделенное вещество идентично стандарту ОК. В ИК-спектре регистрируются полосы поглощения ассоциированных ОН-групп в области 3450—3200 см^{-1} и С=О группы при 1689 см^{-1} .

Наличие олеаноловой кислоты также подтверждено химическими сдвигами атомов ^1H в спектре ЯМР стандарта олеаноловой кислоты и химическими сдвигами атомов ^1H гидролизата, полученного в среде субкритической воды. В ^1H ЯМР спектре (ДМСО- d_6) стандарта ОК присутствуют химические сдвиги атомов ^1H (δ , м.д.): (CH_3): 0,66; 0,704; 0,838; 0,859; 0,880; 1,079; 1,592; (H-12): 5,144; (H-18): 2,735; (H-3): 2,981; (H кислотной группы): 11,967. В ^1H ЯМР спектре (ДМСО- d_6) гидролизата, полученного при 210 °С в течение 60 мин, наблюдаются, соответственно, сигналы (δ , м.д.): (CH_3): 0,66; 0,702; 0,838; 0,860; 0,879; 1,079; 1,593; (H-12): 5,146; (H-18): 2,742; (H-3): 2,977; (H кислотной группы): 12,042.

Зависимость выхода ОК от температуры субкритической воды (время гидролиза 60 мин) представлена на рис. 2. Как видно из рисунка, при 210 °С наблюдается наибольший выход ОК. При этом в силу незавершенности реакции на хроматограммах гидролизатов, полученных при температурах до 200 °С, регистрируются пики исходных аралозидов и монозидов, являющихся промежуточными продуктами (рис. 3).

Как видно из рис. 3в, при температуре 210 °С гидролиз проходит нацело, т.к. ни в осадке, ни в растворе аралозиды не обнаружены. В то же время, как следует из полученных результатов, количество ОК оказывается меньше теоретически рассчитанного значения, которое составляет 309 мг/г сырья. Можно предположить, что агликон при этих условиях подвергается деструкции. Подтверждением служит изучение термоустойчивости чистой ОК в среде субкритической воды. Количество ОК составили 81 %, 77 % и 74 % от исходного после выдержки в течение 60 мин при 200, 210 и 230 °С соответственно. Изучение продуктов деструкции или не описанного ранее превращения ОК в среде субкритической воды представляет собой самостоятельную задачу, которая запланирована на следующем этапе.

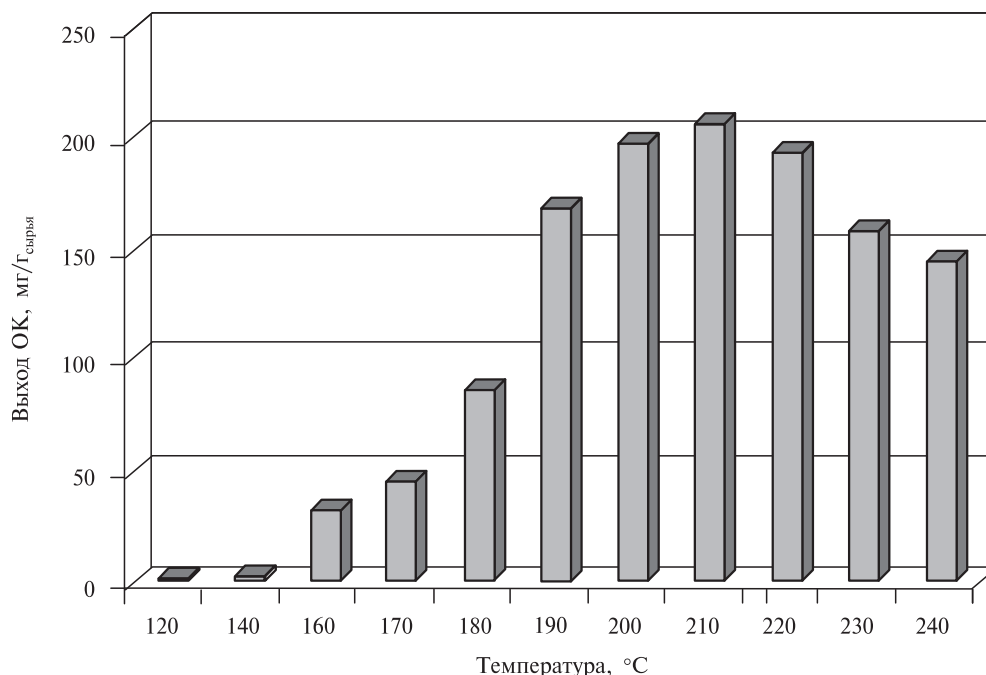


Рис. 2. Зависимость выхода ОК от температуры субкритической воды (время гидролиза 60 мин)

Представленная на рис. 4 зависимость выхода ОК от длительности гидролиза в субкритической воде при 210 °С позволяет определить его оптимальную продолжительность. Как видно из представленных данных, процесс полностью завершается за 60 мин.

С целью определения оптимального количества используемого образца сапарала было изучено влияние величины навески (от 25 до 100 мг) на выход ОК. Результаты представлены в виде диаграммы на рис. 5. Установлено, что при массе образца, превышающей 50 мг, значительного повышения выхода ОК не происходит, т.к. увеличение массы загружаемого сырья приводит к изменению соотношения фаз и затруднению массообменных процессов в реакторе, а также затрудняет обработку гидролизата в связи со значительным увеличением объема растворителя для перевода полученной ОК в раствор.

В ходе работы изучена возможность понижения температуры процесса за счет добавления дополнительного источника ионов H^+ в среду гидролиза. Ранее успешно проведена подобная работа по подбору оптимальной кислоты и ее концентрации для снижения температуры проведения гидролиза сапонинов солодки [18]. В качестве среды гидролиза использованы водные растворы серной кислоты концентрацией от 0,5 до 4,5 % и изучен выход ОК при температурах 200 и 210 °С. Результаты представлены в таблице 1.

Влияние кислоты на выход ОК оказывается незначительным, и тем не менее, использование водного раствора серной кислоты концентрацией 1,5 % позволяет повысить выход ОК на 9 и 17 % при 200 и 210 °С соответственно. Исходя из приведенных результатов, при использовании добавок серной кислоты (0,5–4,5 %) оптимальными являются следующие условия: температура 210 °С, время реакции 60 мин, навеска сапарала 50 мг, объем воды 7 мл. Однако при рассмотрении

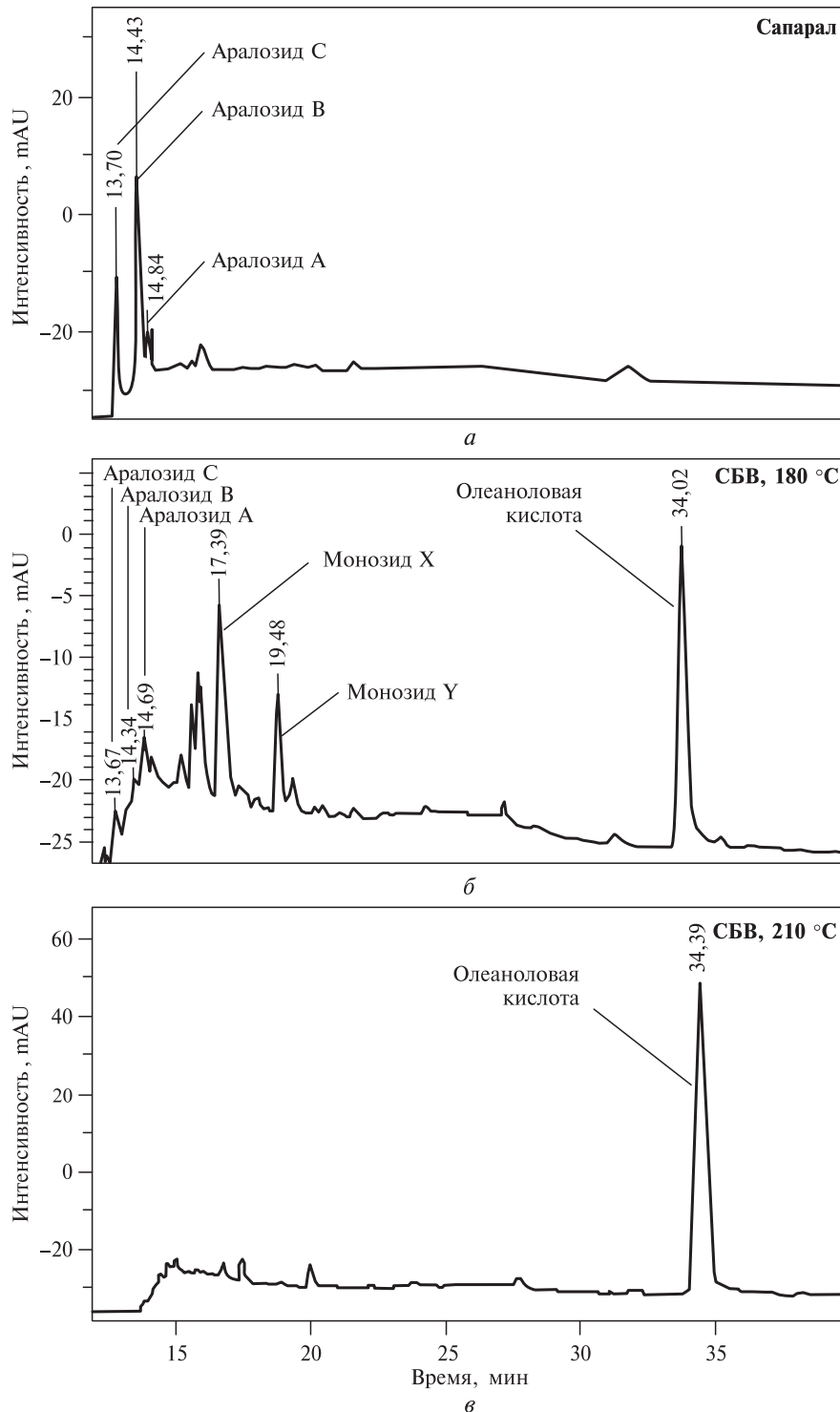


Рис. 3. Хроматограммы исходного сапарала (а) и продуктов его гидролиза, полученных в СБВ при температурах 180 °С (б) и 210 °С (в) ($RT_{\text{аралозид С}} = 13,70$ мин; $RT_{\text{аралозид В}} = 14,43$ мин; $RT_{\text{аралозид А}} = 14,84$ мин; $RT_{\text{монозид Х}} = 17,39$ мин; $RT_{\text{монозид Y}} = 19,48$ мин; $RT_{\text{олеанол. к-та}} = 34,39$ мин)

*Получение олеаноловой кислоты и ее производных
гидролизом аралозидов аралии маньчжурской в субкритической воде*

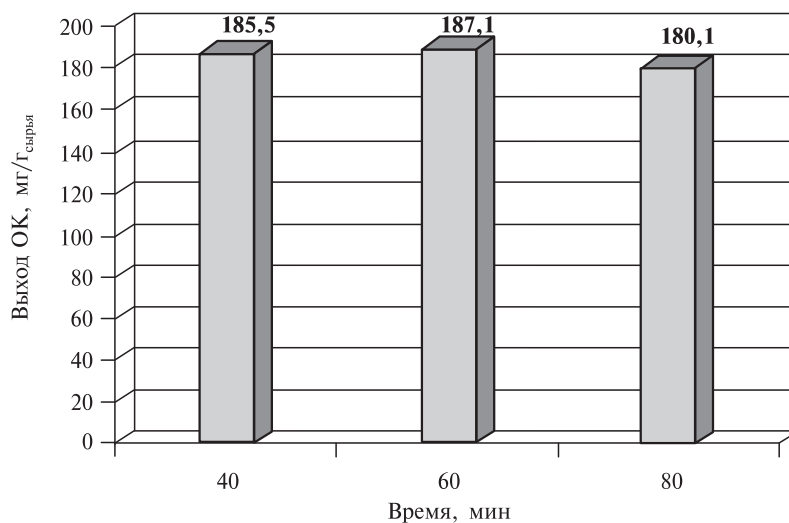


Рис. 4. Зависимость выхода ОК от длительности гидролиза при 210 °С

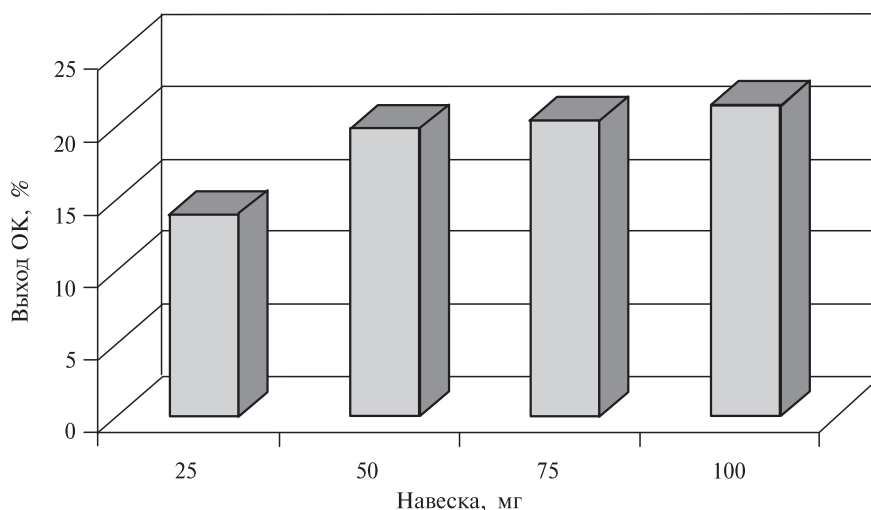


Рис. 5. Зависимость выхода ОК от величины навески

Таблица 1

**Зависимость выхода ОК (мг/г сырья) от концентрации серной кислоты
при 200 и 210 °С**

Температура, °С	Концентрация серной кислоты, %				
	0	0,5	1,5	3,0	4,5
Выход ОК, мг/г сырья					
200	208	206	229	186	180
210	208	217	240	220	220

Таблица 2

Сравнение методик получения ОК из сапарала

Метод	Время гидролиза, мин	Температура, °С	Среда	Выход ОК, мг/г сырья	Концентрация ОК в продукте, %
Традиционный гидролиз	120	100	CH ₃ COOH—HCl—H ₂ O*	168	49,2
Гидролиз в субкритической воде	60	200	H ₂ O	198	36,5
		210		206	49,2
Гидролиз в субкритической 1,5 % H ₂ SO ₄	60	200	1,5 % H ₂ SO ₄	230	43,7
		210		240	48,8

*Состав смеси для гидролиза: ледяная уксусная кислота — концентрированная (35—38 %) соляная кислота — вода в объемном соотношении 3,5 : 1 : 5,5.

перспектив использования кислотных добавок следует учитывать необходимость дальнейшей очистки получаемых субстанций.

Для оценки эффективности гидролиза аралозидов сапарала в среде субкритической воды проведено сравнение с результатами, полученными традиционным методом (см. таблицу 2).

Как видно из данных таблицы 2, преимущество предложенного процесса перед традиционным гидролизом заключается в уменьшении времени гидролиза в 2 раза при сохранении количества образующейся ОК. При этом отпадает необходимость последующей регенерации и утилизации немалого количества растворителей и кислот, неизбежных при использовании традиционных методик получения таких субстанций.

Другим существенным преимуществом предложенной методики является исключение этапа очистки полученных субстанций от их ацетатов и эфиров, образование которых сопутствует различным вариантам традиционного кислотного гидролиза.

Также следует отметить, что варьирование температуры субкритической воды позволяет получать смеси, содержащие ОК и ее производные в различных соотношениях (см. рис. 3): от субстанции, содержащей только дигликозиды ОК (исходный сапарал), и субстанции, содержащей дигликозиды, моногликозиды и ОК (при 180 °С), до субстанции, содержащей только ОК (при 210 °С). Изменение качественного и количественного состава субстанций, полученных при различных температурах, может обусловить появление новых свойств как за счет вариации состава смесей, так и за счет возможных синергетических эффектов действия их биологически активных компонентов.

Таким образом, предложенная методика позволяет получать фармацевтически значимые субстанции на основе выпускаемого в РФ препарата «Сапарал» в среде субкритической воды.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-03-12271 офи_м). Авторы благодарят за предоставленный препарат «Сапарал» главного научного сотрудника ГНУ ВИЛАР (г. Москва), д-ра фарм. наук И.Н. Зилфикарова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hostettmann K.A., Marston A.* Saponins. Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1995. 564 с.
2. *Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П.* Фармакогнозия. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2002. 656 с.
3. *Минина С.А., Каухова И.Е.* Химия и технология фитопрепаратов: Учебник для вузов. М.: Гэотар-Мед, 2004. 558 с.
4. *Sotova L.O., Nadar A., Ramtanan P., Shode F.O.* Phytomedicine. 2003. Vol. 10. No. 2—3. P. 115.
5. *Искендеров Г.Б.* Хим. фарм. журнал. 1990. № 2. С. 55.
6. *Shishodia S., Majumdar S., Banerjee S., Aggarwal B.B.* Cancer Res. 2003. Vol. 63. No. 15. P. 4375.
7. *Liu J.J.* of Ethnopharmacology. 1995. Vol. 49. No. 2. P. 57.
8. *Tokuda H., Ohigashi H., Koshimizu K., Ito Y.* Cancer Letters. 1986. Vol. 33. No. 3. P. 279.
9. *Lee H.Y., Chung H.Y., Kim K.H., Lee J.J., Kim K.W.* J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1994. Vol. 120. No. 120. P. 513.
10. *Мальчуковский Л.Б., Либизов Н.И.* Фармация. 1971. № 2. С. 68.
11. *Деста И., Оганесян Э.Т., Швец Э.Ф.* Фармация. 1981. № 6. С. 12.
12. *Xiao K., Yi Y.H., Wang Z.Z., Tang H.F., Li Y.Q.J.* Nat. Prod. 1999. Vol. 62. No. 7. P. 1030.
13. *Васильева Н.В., Смолина Т.А., Тимофеева В.К.* Органический синтез: Учебник для вузов. М.: Просвещение, 1986. 366 с.
14. *Бочков А.Ф., Афанасьев В.А., Заиков Г.Е.* Образование и расщепление гликозидных связей. М.: Наука, 1978. 179 с.
15. *Taylor J.D., Steinfeld J.I., Tester J.W.* Indus. & Engin. Chem. Res. 2001. Vol. 40. No. 1. P. 67.
16. *Cotisar C.M., Savage P.E.* Green Chemistry. 2004. Vol. 6. P. 227.
17. *Галкин А.А., Лунин В.В.* Успехи химии. 2005. Т. 74. № 1. С. 24.
18. *Тихомирова К.С., Лекарь А.В., Борисенко С.Н., Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И.* СКФ-ТП. 2010. Т. 5. № 2. С. 21.
19. *Филонова О.В., Лекарь А.В., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И.* СКФ-ТП. 2015. Т. 10. № 1. С. 3.
20. Государственная фармакопея СССР. XI изд. Вып. 2. М.: Медицина, 1990. 400 с.
21. *Ладыгина Е.Я., Гринкевич Н.И., Сафронич Л.Н.* Химический анализ лекарственных растений: Учеб. пособие для фармацевтических вузов и факультетов. М.: Высшая школа, 1983. 176 с.

HYDROLYSIS OF ARALOSIDES FROM ARALIA MANCHURIAN IN SUBCRITICAL WATER TO OLEANOLIC ACID AND ITS DERIVATIVES

**O.V. Filonova, A.V. Lekar, S.N. Borisenko, E.V. Vetrova,
E.V. Maksimenko, N.I. Borisenko, V.I. Minkin**

Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

A method to obtain oleanolic acid (OA) and its derivatives by hydrolysis of aralia manchurian in subcritical water is developed. It is carried out on an example of pharmaceutical preparation «Saparal» at 120—240 °C in static regime. A maximal yield of OA is obtained at 210 °C.

Key words: subcritical water, aralosides, aralia manchurian, saponins, saparal, oleanolic acid, HPLC-MS.
