

---

УДК 542.06.542.61.542.46.808.542.97.542.93

## «ОНЕ-ПОТ»-МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ ОЛЕАНОЛОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ КОРНЕЙ АРАЛИИ МАНЬЧЖУРСКОЙ В СРЕДЕ СУБКРИТИЧЕСКОЙ ВОДЫ

©2019 г. А. В. Лекарь, Е. В. Максименко, С. Н. Борисенко,  
Е. В. Ветрова, С. С. Хизриева, Н. И. Борисенко\*, В. И. Минкин

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

\*boni@ipoc.rsu.ru

Поступила в редакцию: 07.11.2018 г. Прошла рецензирование: 21.11.2018 г.  
Принята к публикации: 21.11.2018 г.

Разработан и реализован «опе-пот»-метод получения олеаноловой кислоты (ОК) из корней аралии маньчжурской *Aralia mandshurica* Rupr. в среде субкритической воды (СБВ) в температурном интервале от 140 до 230 °C. Установлено, что этот способ позволяет достичь выхода ОК, сопоставимого с традиционными методами, без использования каталитических добавок и при затрате времени в 16 раз меньше, чем при обычном двухшаговом процессе получения ОК. Предложенная методика позволяет создавать экологически чистые технологии производства ОК в среде СБВ и, как следствие, лекарственных форм на основе аралозидов аралии маньчжурской.

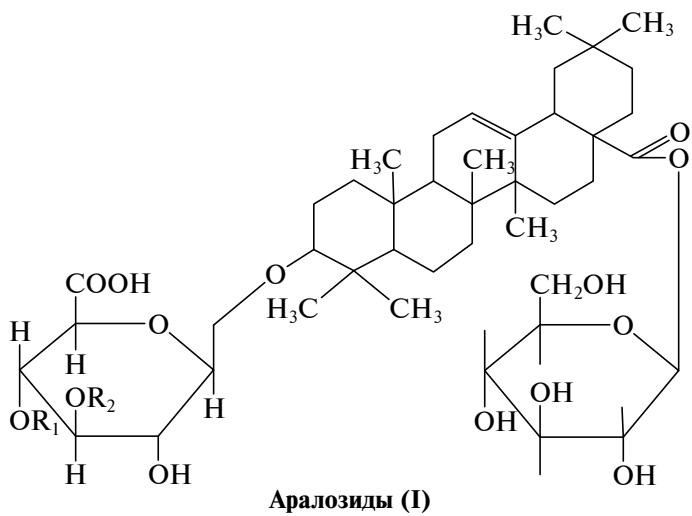
**Ключевые слова:** «опе-пот», аралия маньчжурская, олеаноловая кислота, ВЭЖХ, субкритическая вода.

---

## ВВЕДЕНИЕ

К числу природных соединений, представляющих огромный потенциал для фармакологии, можно отнести тритерпеновые сапонины — тритерпеноидные вторичные растительные метаболиты, представленные, например, в аралии маньчжурской [1]. Использование последней в терапевтических целях связано с содержанием в корнях растения до 5 % тритерпеновых сапонинов — аралозидов. Тритерпеновые сапонины корней аралии маньчжурской (**I**) и их агликон — олеаноловая кислота (**II**) представлены на рис. 1.

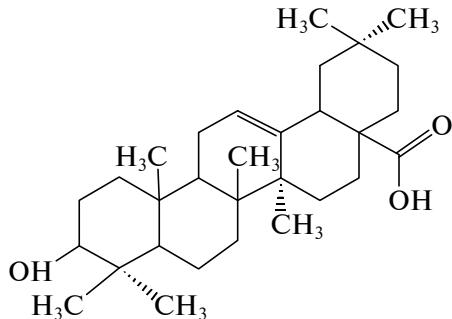
ОК (**II**) представляет собой пентациклический тритерпен, который встречается во многих растениях (выделена из более чем 1620 видов растений) в виде свободной кислоты или агликона сапонинов. В растениях ОК образуется путем биосинтеза из люпана, который может перегруппироваться в изомер ОК — урсоловую кислоту или окислиться до амирина. За последнее десятилетие было опубликовано более 700 научных статей по исследованию тритерпеноидов, отражающих огромный интерес и прогресс в понимании этих соединений. Работы включали выделение и очистку этих тритерпенов из различных растений и трав, химические модификации для получения более эффективных и водорастворимых производных, фармакологические исследования их полезного действия и токсичности, а также клиническое использование при различных заболеваниях, включая противоопухолевую химиотерапию [2].



Аралозид А  $R_1=L$ -арabinоза,  $R_2=H$

Аралозид В  $R_1=L$ - арабиноза,  $R_2=L$ -арабиноза

Аралозид С  $R_1=L$ -галактоза,  $R_2=D$ -ксилоза



**Рис. 1.** Структурные формулы аралозидов ( $MW_{сред} = 1024$ ) корней аралии и олеаноловой кислоты ( $C_{30}H_{48}O_3$ ,  $MW = 456,71$ )

Известно, что ОК, ее природные и полусинтетические аналоги демонстрируют широкий спектр активности — противовоспалительную [3], гепатопротекторную [4], гастропротекторную [5], анти-ВИЧ [6], цитотоксическую [7], противоопухолевую [8] и антиоксидантную [9]. В обзоре [10] показано, что олеаноловая и урсоловая кислоты проявили антибактериальную, противовирусную активность, а также антипротозольные эффекты. Исследовано потенциальное использование этих тритерпенов против человеческих патогенов. В обзоре [11] внимание сосредоточено на этих свойствах, а также на противоздушной, спазмолитической, антиangiогенной, противоаллергической, противовирусной и иммуномодулирующей активности. Представлена подборка наиболее актуальных научных статей и технических отчетов о химических, доклинических и клинических исследованиях свойств ОК и ее производных. В [12] выполнена оценка роли ОК

по ингибированию биосинтеза меланина, активности продуцирования гиалуроновой кислоты, эффектов анти-ожирения за счет ингибирования липазы и дифференциации адипоцитов (клеток, из которых в основном состоит жировая ткань).

В [13] изучено получение ОК из препарата «Сапарал» в среде СБВ, находящейся в жидким состоянии в температурном диапазоне от 100 до 374 °C и давлении до 218 атм [14]. В этом температурном интервале значительно изменяются такие важнейшие физико-химические характеристики воды, как константа диэлектрической проницаемости, поверхностное натяжение, вязкость и константа ионизации. С увеличением температуры константа диэлектрической проницаемости, поверхностное натяжение и вязкость уменьшаются, тогда как константа ионизации воды увеличивается и достигает максимума (на 3 порядка выше) в области 270 °C. Вода при таких температурах ведет себя подобно полярному органическому растворителю и при этом может выступать как кислотный или щелочной катализатор с одной стороны и как растворитель — с другой. Уникальной особенностью СБВ, как растворителя, является способность восстанавливать значения физико-химических параметров (константа диэлектрической проницаемости, поверхностное натяжение, вязкость, константа ионизации) до обычных величин при охлаждении воды до комнатной температуры. Это означает, что, охладив СБВ до комнатной температуры, можно получить среду, которая имеет такую же способность растворять целевые вещества, какую эта вода имела до нагревания. Все это открывает широчайшие перспективы для использования СБВ в экстракции и синтезе новых производных из вторичных растительных метаболитов, поскольку позволяет избежать использования дорогостоящих, а зачастую и токсичных и/или пожароопасных органических растворителей, а также исключить этапы очистки [15, 16]. Сочетание свойств воды как наиболее экономически доступного и экологически чистого растворителя и реагента открывает путь к освоению новой методики получения ОК из корней аралии в среде субкритической воды. С другой стороны, в настоящее время в рамках концепции «зеленой химии» наблюдается лавинообразный рост числа исследований, посвященных разработке методов и процедур так называемой «one-pot»-техники (техники «одного реактора») [17].

«One-pot»-техника относится к процессам, включающим ряд отдельных реакций, проводимых последовательно в одном реакционном сосуде для получения целевого продукта без выделения и очистки промежуточных продуктов после каждой стадии. Этот подход очень привлекателен, поскольку позволяет избежать длительного процесса разделения и очистки промежуточных химических соединений, экономит время и ресурсы.

Цель представленной работы — разработка и реализация «one-pot»-методики получения ОК в среде СБВ из корней аралии, минуя стадию экстракции и очистки аралозидов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аралия маньчжурская (*Aralia mandshurica* Rupr.) — официальное название растения, корни которого являются фармакопейным сырьем. В качестве объекта исследования в работе использованы корни *Aralia mandshurica*, приобретенные в аптечной розничной сети г. Ростова-на-Дону ИП Матюшина «Мир экологически чистых лекарственных трав».

Ацетонитрил (HPLC) и вода (HPLC) приобретены у фирмы Merck (Германия). Серная кислота и хлороформ марки о. с. ч. были поставлены ОАО «Вектон» (Россия). Стандарт ОК ( $C_{30}H_{48}O_3$ , MW= 456,71), ≥98 %, был приобретен у фирмы MP Biomedicals США.

Для определения количества ОК использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), для которого были разработаны следующие условия: колонка ProSher C18 St 4×150 мм, зернение 3 мкм; состав подвижной фазы:  $CH_3CN : 0,01\text{ н } H_2SO_4 - A : B$ ; режим элюирования, градиент A : B — 10 : 90 (0—6 мин) → 60 : 40 (6—28 мин) → 100 : 0 (28—41 мин) → 10 : 90 (41—43 мин) → 10 : 90 (43—53 мин); температура колонки 30 °С; скорость потока подвижной фазы 0,25 мл/мин; длина волны УФ-детектора — 205 нм; время анализа — 53 мин; объем вводимой пробы — 0,50 мкл. Исследование проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1200» в обращенно-фазном варианте, с диодно-матричным детектированием (ДАД), работающем в диапазоне длин волн от 195 до 950 нм. Тriterпеноиды с изолированной двойной связью имеют в УФ-области спектра максимум поглощения в интервале 198—205 нм [18]. Количественное определение ОК в продуктах обработки корня аралии проводили по методу абсолютной калибровки. В качестве стандарта использовали раствор олеаноловой кислоты в метаноле.

Традиционный способ получения ОК из корней аралии включает две основные стадии. Первая стадия — получение аралозидов из корней аралии путем экстракции с использованием органических растворителей [19]. Вторая стадия — гидролиз продукта экстракции аралозидов, полученных из корней аралии [20].

Первую стадию проводили с использованием хлороформа и метанола, и она включала несколько шагов. Навеску 1 г измельченных корней (размер частиц 0,5—1,0 мм) подвергали предварительной обработке — кипячению в 15 мл хлороформа в круглодонной колбе с обратным холодильником в течение 90 мин для очищения экстракта от неполярных органических компонентов (температура бани 60 °С). Хлороформную вытяжку декантировали через бумажный фильтр, процедуру повторяли дважды. Сыре высушивали от хлороформа и переносили обратно в колбу. Последующие три процедуры заключались в кипячении экстракта в 20 мл метилового спирта с обратным холодильником по 100 мин. Полученные экстракты фильтровали через бумажный фильтр, объединяли и анализировали методом ВЭЖХ. Объединенную метанольную вытяжку помещали в роторную колбу и отгоняли спирт под вакуумом на водяной бане. Высущенный экстракт вновь анализировали методом ВЭЖХ. Суммарные временные затраты на экстракцию составили 480 мин.

Вторую стадию — гидролиз экстракта корней аралии, проводили с использованием соляной кислоты и метанола. К навеске 90 мг экстракта корня аралии, полученного на первой стадии, добавляли последовательно 5 мл дистиллированной воды, 15 мл метанола и 3,5 мл концентрированной соляной кислоты при частом перемешивании. Длительность гидролиза составила 8 ч, меньшее время давало заниженные результаты. Полученную реакционную смесь фильтровали через бумажный фильтр, осадок на фильтре промывали водой до нейтрального pH, растворяли в 80 %-ном этаноле и анализировали. Этанольный раствор сушили на воздухе при комнатной температуре под вентилятором. Полученный продукт анализировали на содержание ОК методом ВЭЖХ. Итог временных затрат — 480 мин, общие временные затраты двухступенчатой традиционной схемы получения ОК составили 960 мин (16 ч).

Процедуру «опе-пот»-обработки корней аралии в СБВ проводили с использованием самодельного реактора (автоклава) с внутренним объемом 10 мл [21]. Навеску измельченных корней (размер частиц 0,5–1,0 мм) массой 1 г помещали в реактор, в который затем добавляли 8 мл дистиллированной воды. Реактор герметично закрывали и помещали в сушильный шкаф, где выдерживали при определенной температуре (точность  $\pm 1$  °C) в течение заданного интервала времени и после этого охлаждали до комнатной температуры (30 мин).

Содержимое реактора фильтровали через бумажный фильтр в мерный цилиндр, промывая реакционную смесь дистиллированной водой до отсутствия цвета. Для определения количества ОК, содержащейся в оставшемся на фильтре осадке, его растворяли в 50 мл горячего 96 %-ного этанола. Спиртовой раствор собирали в мерную колбу на 50 мл и аликвотные части полученных водного и этанольного растворов анализировали на содержание ОК методом ВЭЖХ. Этanolальную фракцию, содержащую ОК, сушили при комнатной температуре под вентилятором и определяли количество ОК в сухом продукте методом ВЭЖХ.

Таким образом, предложенная техника «опе-пот» для получения ОК из корней аралии в СБВ включает один шаг — обработку корней аралии с использованием среды СБВ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Продукты, содержащие ОК, были получены из корней аралии с использованием двух разных схем (рис. 2).

Путь 1 соответствует двухстадийному способу получения ОК и включает традиционную экстракцию арапозидов метанолом с последующим гидролизом полученного экстракта с использованием концентрированной HCl. Путь 2 демонстрирует «опе-пот»-технику получения ОК с использованием СБВ. Полученные целевые продукты анализировали методом ВЭЖХ на содержание ОК.

С учетом того, что гидролиз в СБВ наиболее полно протекает в диапазоне температур 210–230 °C, эффективность «опе-пот»-техники получения ОК в этой среде изучали в интервале от 140 до 230 °C. Результаты, полученные обработкой корней аралии различными способами, представлены на рис. 3.

Из диаграммы видно, что традиционный способ (10) позволяет получить 19,2 мг олеаноловой кислоты из 1 г корней аралии. Переход к использованию «опе-пот»-техники получения ОК в среде СБВ в диапазоне 140–220 °C (рис. 3, столбцы 1–5) демонстрирует увеличение выхода ОК от 0 (1) до 19 мг (5) из 1 г сырья. Увеличение температуры СБВ до 230 °C (6) ведет к уменьшению выхода ОК до 16 мг. Такое поведение может быть обусловлено термической деструкцией целевой ОК при 230 °C, что было показано ранее в [13], где была изучена термическая устойчивость стандарта ОК в СБВ в течение 60 мин при 200, 210 и 230 °C. Было установлено, что содержание ОК, определенное также методом ВЭЖХ, после обработки в среде СБВ составляло 81,3, 77 и 74 % при 200, 210 и 230 °C, соответственно [13].

Таким образом, применение предлагаемой «опе-пот»-техники получения ОК в среде СБВ позволяет достичь сопоставимых результатов (за 1 ч) при температуре СБВ 220 °C без использования каких-либо катализитических добавок. Выход ОК при этих условиях составляет 19 мг олеаноловой кислоты из 1 г корней аралии. В то же время традиционная схема получения ОК дает сопоставимый выход почти

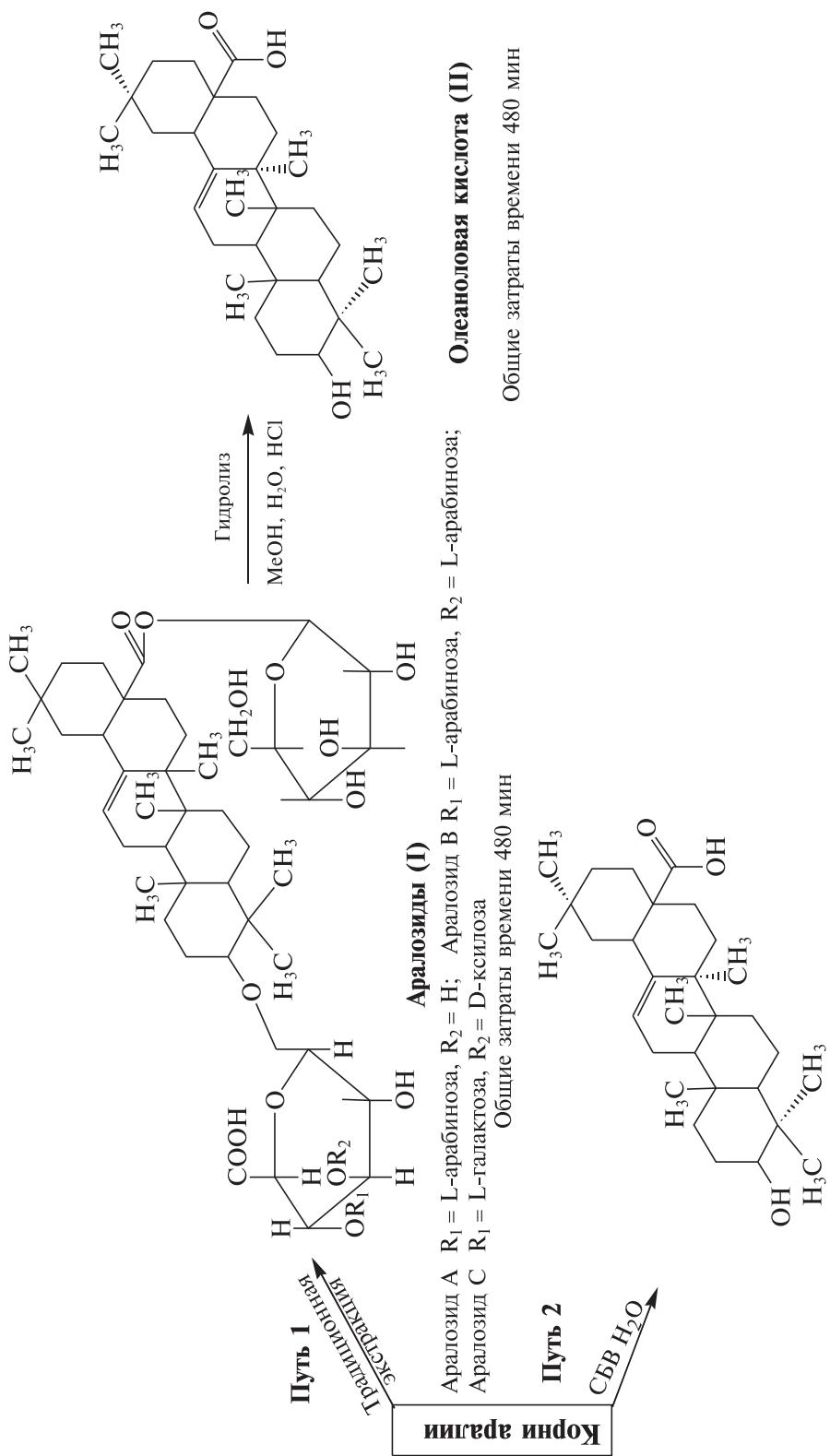
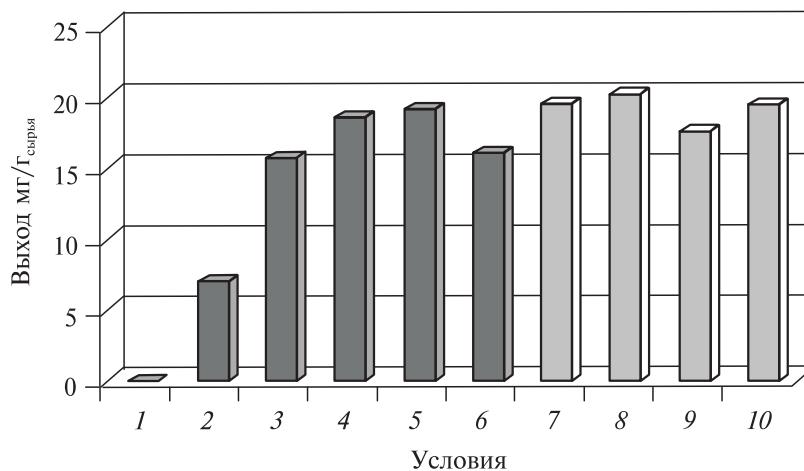


Рис. 2. Схемы получения олеаноловой кислоты из корней аралии маньчжурской



**Рис. 3.** Содержание ОК в продуктах обработки корней аралии за 60 мин при различных температурах, °C:  
 1 – 140; 2 – 180; 3 – 200; 4 – 210; 5 – 220; 6 – 230; 7 – 200 + 1,5 % H<sup>+</sup>; 8 – 210 + 1,5 % H<sup>+</sup>; 9 – 220 + 1,5 % H<sup>+</sup>; 10 – традиционная двухступенчатая процедура

за 16 ч. При этом в традиционном процессе получения ОК используются концентрированная соляная кислота и метанол.

Было также изучено влияние следовых добавок соляной кислоты на выход ОК (столбцы 7–9, рис. 3) в среде СБВ. Как видно из этих данных, применение добавок соляной кислоты (1,5 %) приводит к незначительному увеличению выхода ОК – 19,4 и 20,1 мг/г при 200 и 210 °C, соответственно.

Сравнение эффективности предложенной «one-pot»-техники и традиционной методики получения ОК из корней аралии приведено в таблице.

Таким образом, впервые для производства ОК из корней аралии маньчжурской предложена и реализована новая экологически чистая «one-pot»-методика с использованием среды СБВ. Предложенный подход получения ОК позволяет

*Таблица*  
**Сравнение эффективности методов получения ОК**

Метод получения ОК	Общие затраты времени, мин*	Температура, °C	Концентрация кислоты, %	Количество ОК, мг в жидком продукте из 1 г сырья
<b>Путь 1.</b> Традиционная двухстадийная процедура (экстракция + гидролиз HCl)	960	100	5,2	19,2
<b>Путь 2.</b> «One-pot»-техника извлечения ОК в СБВ (1,5 % HCl)	60	210	1,5	20,1
<b>Путь 2.</b> «One-pot»-техника извлечения ОК в СБВ	60	220	0	19,0

\* Приведенные данные не включают длительность процесса сушки.

исключить использование дорогостоящих токсичных органических растворителей, не требует проведения раздельных процедур экстракции и гидролиза, а также исключает процедуры очистки продуктов экстракции.

Сопоставимые выходы ОК получены путем «one-pot»-метода за время в 16 раз меньшее, чем это требуется при использовании традиционных процедур.

Предлагаемый метод имеет потенциал для будущего развития недорогих и экологически чистых технологий производства новых веществ из растительного сырья в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Работа выполнена при финансовой поддержке внутреннего гранта Южного федерального университета (проект № ВнГр-07 / 2017-04).

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Алексеев Ю.Е., Жмылев П.Ю., Карпухина Е.А. Деревья и кустарники. Энциклопедия природы России. М., 1997. 592 с.
2. Pollier J., Goossens A. // Phytochemistry. 2012. Vol. 77. No 5. P. 10.
3. Lee W., Yang E. J., Ku S. K., Song K. S., Bae J. S. // Inflammation. 2013. Vol. 36. No 1. P. 94.
4. Gabriel A., Gutierrez-Rebolledo A., Siordia-Reyes G., Meckes-Fischer M., Jimenez-Arellanes A. // Asian Pacific J. of Tropical Medicine 2016. Vol. 9. No 7. P. 644.
5. Rodriguez J.A., Astudillo L., Schmeda-Hirschmann G. // Pharmacol. Res. 2003. Vol. 48. P. 291.
6. Han B., Peng Z. // J. of Chemical and Pharmaceutical Research. 2014. Vol. 6. No 4. P. 438.
7. Tuncay S., Senol H., Guler E.M., Ocal N., Secen H., Kocyigit A., Topcu G. // Med Chem. 2018. Vol. 14. No 6. P. 617.
8. Meng Y.Q., Feng C.Q., Zhang L.F., Zhang M., Zhao N. // Yao Xue Xue Bao. 2015. Vol. 50. No 4. P. 469.
9. Bai X., Lai T., Zhou T., Li Y., Li X., Zhang H. // Molecules. 2011. Vol. 23. P. 1395.
10. Jessica J.A., Lago J.H., Laurenti M. D., Eduardo S. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015. Article ID 620472. P. 14.
11. Córdova C., Gutierrez B., Martínez-García C., Martin R., Gallego-Muñoz P., Hernández M., Nieto M.L. // PLoS One. 2014. Vol. 9. No 4. P. 91282.
12. Chen S., Wen X., Zhang W., Wang C., Liu J., Liu C. // FASEB J. 2017. Vol. 31. No 3. P. 108.
13. Filonova O.V., Lekar A.V., Borisenko S.N., Vetrova E.V., Maksimenko E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. // Russian Journal of Physical Chemistry B. 2016. Vol. 10. Is. 7. P. 1085.
14. Галкин А.А., Лунин В.В. // Успехи химии. 2005. Т. 74. №1. С. 24.
15. Vetrova E.V., Maksimenko E.V., Borisenko S.N., Lekar A.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. // Russian Journal of Physical Chemistry B. 2017. Vol. 11. Is. 7. P. 1202.
16. Lekar A.V., Borisenko S.N., Vetrova E.V., Filonova O.V., Maksimenko E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. // Natural Product Communications. 2015. Vol. 10. No 11. P. 1801.
17. Hayashi Y. // Chem. Sci. 2016. Vol. 7. P. 866.
18. Генкина Г.Л., Мжельская Л.Г. // Химия природных соединений. 1977. № 2. С. 220.
19. Ладыгина Е.Я., Гриневич Н.И., Софонович Л.Н. Химический анализ лекарственных растений. Учебное пособие для фармацевтических вузов и факультетов. М.: Высшая школа, 1983. С. 176.
20. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. Руководство Р 4.1.1672-03 4.1. Методы контроля. Химические факторы. 2003. С. 316.
21. Lekar A.V., Filonova O.V., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. // Russian Journal of Physical Chemistry B. 2015. Vol. 9. Is. 7. P. 1043.

*A.B. Лекарь, Е.В. Максименко,  
С.Н. Борисенко, Е.В. Ветрова, С.С. Хизриева, Н.И. Борисенко, В.И. Минкин*

---

**«ONE-POT»-TECHNIQUE FOR PRODUCTION OF OLEANOLIC ACID  
FROM THE ROOTS OF ARALIA MANDSHURICA BY SUBCRITICAL  
WATER**

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

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

The presented work is aimed at the development a «one-pot»-technique for production oleanolic acid (OA) from the roots of Aralia mandshurica *Aralia mandshurica* Rupr. using the subcritical water (SBW). For the first time SBW that serves as a reactant and a solvent has been used to obtain OA in good yields starting from the roots of of Aralia mandshurica.

This method of preparation of OA allows one to avoid the use of toxic organic solvents. The good yields of the targeted OA can be obtained for the period of time which is 16 times shorter than needed by the traditional procedures.

**Key words:** «one-pot», roots of Aralia mandshurica, oleanolic acid, HPLC, subcritical water.

---