

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ «ONE-POT»-МЕТОДА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЛИЦИРРЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ КОРНЕЙ СОЛОДКИ В СРЕДЕ СУБКРИТИЧЕСКОЙ ВОДЫ

© 2018 г. **А. В. Лекарь, Е. В. Максименко, С. Н. Борисенко,
С. С. Хизриева, Е. В. Ветрова, Н. И. Борисенко*, В. И. Минкин**

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

*boni@ipoc.rsu.ru

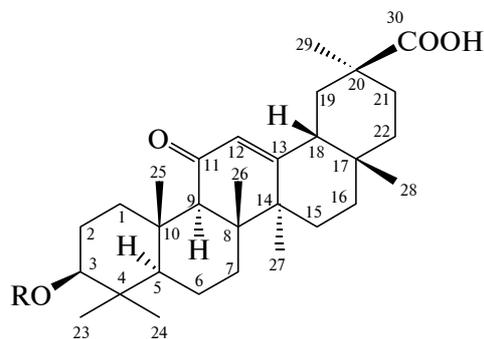
Поступила в редакцию 01.11.2017 г.

Впервые в среде субкритической воды, которая служит в качестве реагента и растворителя, с использованием «one-pot»-метода, исходя из корней солодки *Glycyrrhiza glabra* L. с хорошим выходом получена глицирретиновая кислота (ГЛК). Предложенный метод получения ГЛК позволяет избежать использования дорогостоящих, а зачастую и токсичных органических растворителей и не требует проведения отдельных стадий экстракции и гидролиза. Хорошие выходы целевой ГЛК достигаются за время, в десять раз меньшее, чем это требуется при использовании традиционных процедур. Предлагаемая методика перспективна для будущего развития недорогих и экологически чистых технологий производства ГЛК и ее производных в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности.

К л ю ч е в ы е с л о в а: «one-pot», «один горшок», глицирретиновая кислота, глицирризиновая кислота, субкритическая вода, корни солодки *Glycyrrhiza glabra* L.

ВВЕДЕНИЕ

Солодка (*Glycyrrhiza glabra*) — лекарственная культура, которая растет в разных частях мира и является одной из старейших и широко используемых трав, известных в течение нескольких тысяч лет [1, 2]. Один из основных фармакологических ингредиентов солодки — глицирризиновая кислота (ГК, или 18 β -ГК) — пентациклический тритерпеноид из ряда β -амирина, извлекаемый из корней солодки. Тритерпеноиды структурно связаны со стероидными гормонами и широко изучены химиками и фармакологами [3, 4]. ГК и ее производные обладают широким спектром фармакологической активности: противовирусной, противовоспалительной, антиоксидантной, противоязвенной, противораковой и анти-ВИЧ [5]. Агликон ГК — глицирретиновая кислота (ГЛК) (рис. 1): пентациклическая тритерпеноидная β -амириновая, 18 β -глицирретиновая кислота (18 β -ГЛК), также известная как «эноксолон», встречается в природе в незначительных количествах в лакричнике *Glycyrrhiza glabra* L. По аналогии с ГК, ГЛК оказалась в центре научного интереса из-за ее высокой фармакологической активности [6, 7]. Обладая противовоспалительной и противовирусной активностью, а также способностью активировать иммунную систему, ГЛК все чаще обсуждается в качестве дополнительных или альтернативных медицинских ингредиентов для укрепления здоровья и лечения различных заболеваний.



R = H — глицирретиновая кислота ГЛК $C_{30}H_{46}O_4$ (MW = 470,68)

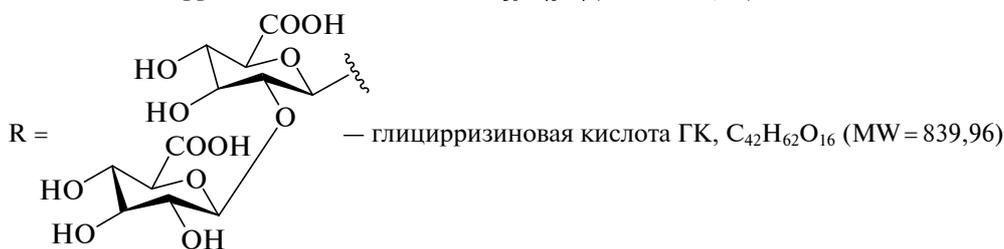


Рис. 1. Структурные формулы глицирретиновой и глицирризиновой кислот

Поскольку в природе ГЛК встречается в растительных матрицах в незначительных количествах, то для ее производства традиционно используют гидролиз экстракта ГК [8] или ее солей в присутствии минеральных кислот. Было показано, что состав побочных продуктов зависит от используемого растворителя [9]. Например, в водных растворах метанола продуктов гидролиза ГК, катализируемых 1н H_2SO_4 , образуются соответствующие метиловые эфиры 18-глицирретиновой кислоты, выделенные с использованием препаративной ТСХ. Гидролиз ГК с 6 %-ной HCl приводил к продуктам, которые содержали другой ряд соединений. В результате кислотного гидролиза ГК (18 β -ГК) с 6 %-ной HCl в дополнение к 18 β -ГЛК были получены незначительные количества 18 β -ГЛК [8, 9]. Поскольку достаточно жесткий кислотный гидролиз 18 β -ГК и ее солей может привести к химической конверсии агликона и расщеплению дисахаридного фрагмента молекулы, была предложена методика получения ГЛК с использованием ферментативного гидролиза ГК. Ферментативные методы, которые были разработаны в последние годы для гидролиза ГК, протекающие в мягких условиях, приводят к образованию промежуточного просапогенина [10]. Следует отметить, что обычный кислотный гидролиз ГК требует от 4 до 16 ч, а ферментативный гидролиз — 144 ч. Таким образом, все традиционные способы гидролиза, приведенные выше, требуют значительных временных затрат. Наряду с этим необходима очистка продуктов гидролиза.

Альтернативой традиционным способам использования кислот для каталитического гидролиза является реакция в субкритической воде (СБВ) [11—13]. В последние годы СБВ использовали в качестве дешевого, экологически чистого растворителя для экстракции [14], синтетических превращений [15] и рециркуляции различных органических отходов, например отходов сельхозпереработки [16]. Гидротермальные реакции привлекают все большее внимание из-за уникальных физико-химических характеристик воды вблизи ее критической точки. В этих условиях вода имеет гораздо более низкую диэлектрическую проницаемость и

существенно большее значение ионного произведения, чем при комнатной температуре. Константа ионного произведения или диссоциации примерно на три порядка выше вблизи критической точки (в диапазоне температур от 220 до 270 °С), чем для обычной жидкой воды. В этих условиях наблюдается высокая концентрация ионов H_3O^+ и OH^- . Благодаря этому, некоторые кислотно-катализируемые органические реакции могут быть проведены в среде СБВ без добавления кислот. Этот факт делает СБВ идеальной средой для реакций гидролиза органических соединений [17].

С другой стороны, в последние годы с ужесточением экологического законодательства в рамках концепции «зеленой химии» наблюдается лавинообразный рост числа исследований, посвященных разработке методов и процедур «one-pot» («в одном горшке»). В химии «one-pot»-синтез представляет собой стратегию повышения эффективности химической реакции, при которой реагент подвергается последовательным химическим реакциям только в одном реакторе. Этот подход весьма привлекателен, поскольку позволяет избежать длительного процесса разделения и очистки промежуточных химических соединений, экономит время и ресурсы и нередко увеличивает выход продуктов реакции. Естественно, интересно применить «one-pot»-стратегию для многочисленных задач, связанных с экстракцией и трансформацией вторичных метаболитов растений. Последующая реализация такой стратегии в виде технологий могла бы открыть перспективу для будущего развития недорогих и экологически чистых производств для фармацевтической, пищевой и косметической промышленности.

В данной работе впервые предлагается проводить в среде СБВ и экстракцию ГЛК-гликозидов, в данном случае ГК, и их гидролиз одновременно: в виде «one-pot»-процедуры. Такой подход позволяет избежать использования дорогостоящих токсичных и пожароопасных органических растворителей на этапе экстракции ГЛК-гликозидов и последующей их очистки. В этой связи целью работы было создание экологически чистой «one-pot»-процедуры для получения ГЛК с хорошим выходом, исходя из корней солодки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Корни солодки, собранные в пойме р. Урал, были приобретены у ТОО «Лакрица Приуралья» (Республика Казахстан, г. Уральск) ГОСТ-22840-77Е. Ацетонитрил (HPLC) и вода для МС-спектрометрии получены у фирмы Merck (Германия), фосфорная и соляная кислоты — у ОАО «Вектон» (Россия). Стандартные вещества: ГК ($\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$, MW = 822,94) $\geq 95\%$, β -ГЛК ($\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$, MW = 470,70) $\geq 97\%$ получены у фирмы Merck (Германия).

Качественный и количественный состав гидролизата изучали с помощью обращенно-фазового варианта высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе «Agilent 1200» (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany) с диодно-матричным детектированием (ДАД). Использовали следующие условия анализа: колонка «ZorbaxSB-C18» 2,1 × 150 мм, 3,5 мкм, подвижная фаза: ацетонитрил (CH_3CN): 0,01н H_2SO_4 — 55 : 45 об. % (изократическое элюирование), температура колонки 30 °С, скорость потока подвижной фазы 0,14 мл/мин, длина волны УФ-детектора — 254, 280, 320 нм, время анализа — 50 мин, объем вводимой пробы — 0,5 мкл. Количественное определение ГЛК в продуктах обработки корня солодки проводили по методу абсолютной калибровки. Калибровочный коэффициент равен 55815. Линейный динамический диапазон равен 0 — 1,0 мг/мл.

Традиционный способ получения ГЛК из корней солодки включает две основные стадии. Первая стадия — получение ГК из корней солодки путем экстракции с использованием органических растворителей с последующей очисткой. Вторая стадия включает гидролиз продукта экстракции ГК для выделения ГЛК с использованием органических растворителей и минеральных кислот, и последующую очистки полученных продуктов. Традиционную экстракцию корней солодки проводили с использованием органических растворителей (этанол, гексан) в несколько стадий. Навеску 1 г измельченных корней (размер частиц 0,5—1,0 мм) подвергали предварительной обработке — кипячению в 30 мл гексана в круглодонной колбе с обратным холодильником в течение 120 мин для удаления мешающих экстракции неполярных органических компонентов. Последующие 3 стадии представляли собой кипячение в 25 мл 2 % NH_4OH в 70 %-ном этаноле с обратным холодильником по 120 мин. Полученные экстракты фильтровали, объединяли и анализировали. Этанольные вытяжки объединяли, высушивали при комнатной температуре под вентилятором и анализировали вновь методом ВЭЖХ (суммарные временные затраты — 480 мин).

Вторую стадию — гидролиз экстракта корней солодки проводили с использованием соляной кислоты. Навеску 0,4 г экстракта солодкового корня растворяли в 4,0 мл горячей дистиллированной воды (60 °С) при активном перемешивании, добавляя 0,7 мл концентрированной соляной кислоты. Гидролиз проводили при 100 °С в течение 4 ч. Полученную реакционную смесь фильтровали через бумажный фильтр, осадок на фильтре промывали водой до нейтрального pH и растворяли в 80 %-ном этаноле (итог временных затрат 240 мин). Общие временные затраты двухступенчатой схемы получения ГЛУ составляют при этом 720 мин (12 ч).

Процедуру «one-pot»-обработки корней солодки в СБВ проводили с использованием реактора (автоклава) с внутренним объемом 10 мл [14]. Навеску измельченных корней (размер частиц 0,5—1,0 мм) массой 1 г помещали в реактор, в который добавляли 7 мл раствора (0—0,25 % водного раствора серной кислоты). Реактор герметично закрывали и помещали в сушильный шкаф, где выдерживали при определенной температуре (точность ± 1 °С) в течение заданного интервала времени. После этого реактор охлаждали до комнатной температуры (15 мин). Его содержимое количественно переносили на бумажный фильтр марки «Белая лента», фильтровали и промывали дистиллированной водой до нейтрального pH, после чего промывали 80 %-ным водным раствором этилового спирта до его обесцвечивания. Аликвоты полученного раствора разбавляли до концентрации, необходимой для анализа с помощью ВЭЖХ. Таким образом, предложенная техника «one-pot» для получения ГЛК из корней солодки в СБВ включает один шаг: обработку корней солодки с использованием среды СБВ (общие временные затраты 60 мин).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Продукты, содержащие ГЛК, были получены из корней солодки с использованием двух разных схем (рис. 2). Путь 1 соответствует традиционному двухстадийному способу получения ГЛК и включает традиционную экстракцию ГК этанолом с последующим гидролизом полученного экстракта с использованием HCl в качестве катализатора. Путь 2 демонстрирует «one-pot» технику получения ГЛК с использованием СБВ. Полученные целевые продукты анализировали методом ВЭЖХ на содержание ГК и ГЛК.

**Использование «one-pot»-метода для получения
лициретиновой кислоты из корней солодки в среде субкритической воды**

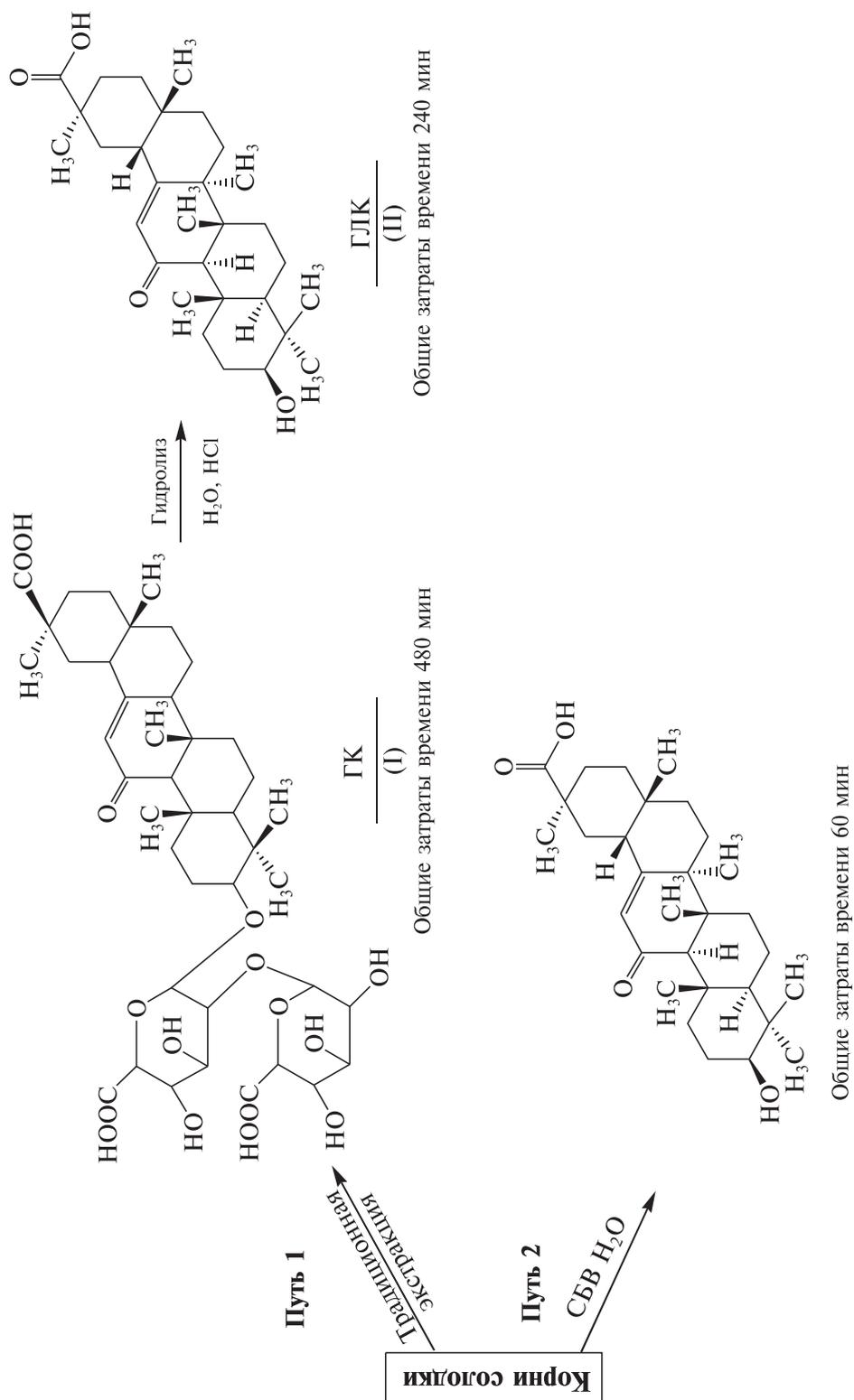


Рис. 2. Основные схемы реакций получения глициретиновой кислоты из корней солодки (*Glycyrrhiza glabra* L.)

На первом этапе количество ГК и ГЛК в исследуемом образце определяли с использованием экстракции. Экстракция ГК из корней солодки была выполнена как с использованием традиционного метода — кипячением в 70 %-ном EtOH с добавкой 2 % NH₄OH, так и с использованием СБВ. Было обнаружено, что максимальный выход ГК из 1 г корней солодки в количестве 50,8 мг обеспечивает традиционная экстракция в этаноле за 4 ч общего времени. Использование же модифицированного метода экстракции в СБВ (120 °С с добавлением 1 % NH₄OH) демонстрирует сопоставимую величину выхода ГК — 48,5 мг, но за 1 ч.

На следующем этапе выходы ГЛК изучали с использованием техники «one-pot» в среде СБВ. Предыдущие исследования показали, что конверсия ГК в ГЛК с применением среды СБВ была наиболее полной в диапазоне температур от 100 до 250 °С [16, 18]. Поэтому в этих пределах была изучена температурная зависимость выхода ГК и ГЛК после обработки корней солодки в среде СБВ. Также был изучен состав продуктов, полученных традиционным извлечением, начиная с корней солодки.

Зависимость количества ГК и ГЛК в продуктах, полученных из корней солодки в СБВ (без каких-либо добавок) в диапазоне температур от 120 до 250 °С, демонстрирует увеличение выхода ГЛК (от 0,6 до 17,1 мг/г) при повышении температуры до 200 °С и сопровождается уменьшением выхода ГК при дальнейшем увеличении температуры. Уменьшение количества ГК, как было показано ранее [16, 18], вызвано процессами гидролиза, в которых СБВ является катализатором. Дальнейшее повышение температуры приводило к уменьшению выхода ГЛК. Анализ полученных данных показал, что при температурах 200—210 °С выход ГЛК из корней солодки был самым высоким, но ниже теоретически рассчитанного. Максимально возможный выход ГЛК (при двухступенчатой традиционной процедуре) из 50,8 мг ГК должен был составить 28,6 мг. При температуре 210 °С следы ГК уже не были зарегистрированы методом ВЭЖХ ни в осадке, ни в растворе. При этом количество ГЛК в продуктах, полученных при температуре 230 °С, уменьшилось до 11 мг (по сравнению с 22,6 мг при температуре 210 °С).

Следовательно, при температуре 210 °С гидролиз ГК проходил полностью, а уменьшение выхода ГЛК при температуре выше 210 °С могло быть обусловлено ее термической деструкцией. Полученные результаты согласуются с предыдущими данными, зарегистрированными при изучении гидролиза ГК до ГЛК в среде СБВ [16]. Таким образом, при температуре 200 °С влияние эффекта термического разложения ГЛК на ее выход пренебрежимо мал. Однако, поскольку константа диссоциации СБВ достигает максимума при более высоких температурах (между 220 и 270 °С), кислотность СБВ при 200 °С оказывается недостаточной для полного гидролиза глицирризиновой кислоты. Итак, при температурах СБВ вблизи и выше 200 °С имеет место присутствие двух конкурирующих процессов: гидролиза ГК, обеспечивающего продуцирование ГЛК, и термической деструкции полученного продукта. Поэтому резонно было попытаться достичь увеличения выхода ГЛК за счет использования каталитических добавок кислот. Для определения влияния следовых количеств кислот была изучена зависимость выхода ГЛК из корней солодки от концентрации серной кислоты и времени обработки (в интервале времени от 10 до 60 мин). Данные по выходу ГК и ГЛК из корней солодки при различных условиях обработки приведены на рис. 3.

Как можно видеть из рис. 3, использование небольших количеств серной кислоты (2 %) позволило достичь по предложенной «one-pot»-методике выхода ГЛК,

**Использование «one-pot»-метода для получения
лицирретиновой кислоты из корней солодки в среде субкритической воды**

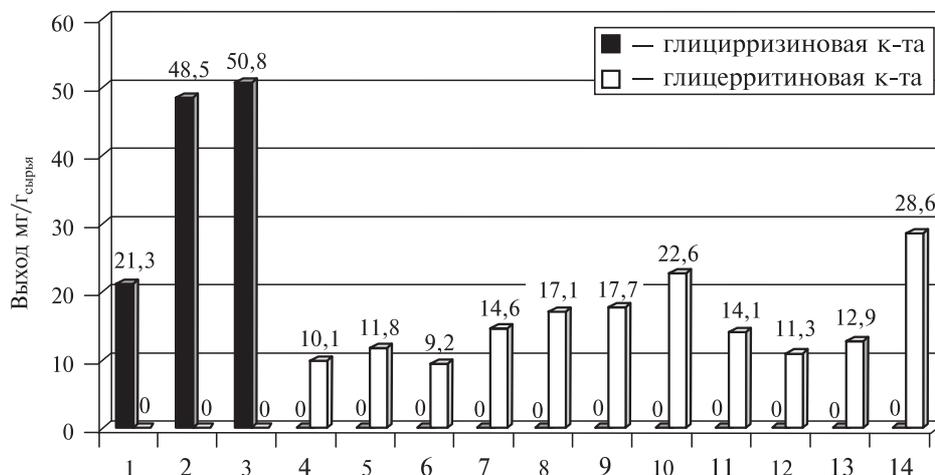


Рис. 3. Выходы ГК и ГЛК из корней солодки, мг:

1 — СБВ 110 °С + 1 % NH₄OH, 60 мин; 2 — СБВ 120 °С + 1 % NH₄OH, 60 мин; 3 — традиционная, 81 °С + 2 % NH₄OH в 70 %-ном EtOH, 360 мин; 4 — СБВ 120 °С + 1 % NH₄OH + СБВ 200 °С, H₂O, 60 мин; 5 — СБВ 120 °С + 1 % NH₄OH + 0,25 % H₂SO₄ + СБВ 200 °С, 60 мин; 6 — СБВ 200 °С + 0,25 % H₂SO₄, 40 мин; 7 — СБВ 200 °С + 0,25 % H₂SO₄, 60 мин; 8 — СБВ 200 °С, H₂O, 60 мин; 9 — СБВ 200 °С + 2 % H₂SO₄, 60 мин; 10 — СБВ 210 °С + 2 % H₂SO₄, 60 мин; 11 — СБВ 220 °С + 2 % H₂SO₄, 60 мин; 12 — СБВ 230 °С + 2 % H₂SO₄, 60 мин; 13 — традиционный гидролиз 5,2 % HCl, 100 °С, 240 мин (кол-во ГЛК); 14 — теоретически возможный выход ГЛК при традиционной процедуре

сравнимого с выходом, получаемым при использовании традиционной техники. При «one-pot»-обработке корней в среде СБВ при 210 °С с добавлением 2 % H₂SO₄ выход ГЛК за 60 мин достиг 22,6 мг, что составляет 80 % от максимально возможного выхода (28,8 мг, условие 14).

При этом значительно снизились временные (с 12 до 1 ч) и материальные затраты. Важным преимуществом предлагаемой процедуры, свободной от использования токсичных органических растворителей, является то, что она позволяет получать конечные продукты в достаточно чистом состоянии. Характерно, что использование техники «one-pot»-обработки корней в среде СБВ без кислотных добавок (условие 8 — СБВ 200 °С, H₂O, 60 мин) позволяет достичь хорошего выхода ГЛК (17,1 мг), что составляет 70 % от максимально возможного.

Сравнение эффективности «one-pot»- и традиционной методики получения ГЛК приведено в таблице.

Таким образом, впервые для получения глицирретиновой кислоты (ГЛК) из корней солодки *Glycyrrhiza glabra* L. разработана новый экологически чистый «one-pot» метод с использованием в качестве среды субкритической воды. Предложенный метод получения ГЛК позволяет избежать использования дорогостоящих, зачастую и токсичных, органических растворителей и не требует проведения отдельных процедур экстракции и гидролиза. Хорошие выходы целевой ГЛК достигаются за время в десять раз меньшее, чем это требуется при использовании традиционных процедур. Предлагаемая методика имеет потенциал для будущего развития недорогих и экологически чистых технологий производства ГЛК и ее производных в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности.

Таблица

Характеристика традиционного и «one-pot» методов получения ГЛК

Метод получения	Общие затраты времени, мин*	Температура, °С	Концентрация кислоты, мас. %	Количество ГЛК, мг в жидком продукте из 1 г исходного образца	Выход ГЛК мас. %**
Путь 1 Традиционная двухстадийная процедура (экстракция + гидролиз HCl)	720	100	5,2	12,9	45,1
Путь 2 «One-pot»-метод извлечения ГЛК в СБВ (2 % H ₂ SO ₄)	60	210	2,0	22,6	79,0
Путь 2 «One-pot»-метод извлечения ГЛК в СБВ	60	210	0,0	17,1	59,8

* Приведенные данные не включают длительность процесса сушки.

** Выход ГЛК (мас. %) определяли для образцов до сушки, т.е. общее количество ГЛК в жидком продукте — $m_{\text{ГЛК}}$ (мг) относили к теоретически возможному выходу — $m_{\text{теор ГЛК}}$ (мг), равному 28,6 мг, и умножали на 100.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке внутреннего гранта Южного федерального университета (проект № ВнГр-07/2017-04) и гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ (проект НШ-8201.2016.3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shibata S.A. // YakugakuZasshi. 2000. Vol. 120. P. 849.
2. Fiore C., Eisenhut M., Ragazzi E., Zanchin G., Armanini D. // J. of Ethnopharmacology. 2005. Vol. 99. P. 317.
3. Ming L.J., Yin A.C.Y. // Natural Product Communications. 2013. Vol. 8. P. 415.
4. Baltina L.A., Kondratenko R.M., Baltina Jr., Plyasunova O.A., Pokrovskii A.G., Tolstikov G.A. // Pharmaceutical Chemistry J. 2009. Vol. 43. P. 539.
5. Wang Z.Y., Nixon D.W. // Nutrition and Cancer. 2001. Vol. 39. P. 1.
6. Tang Z-H., Li T., Chang L-L., Zhu H., Tong Y-G., Chen X-P., Wang Y-T., Lu J-J. // J. of Agricultural and Food Chemistry. 2014. Vol. 62. P. 11910.
7. Csuk R., Schwarz S., Kluge R., Ströhl D. // European J. of Medicinal Chemistry // 2010. Vol. 45. P. 5718.
8. Baltina L.A., Flekhter O.B., Putieva Zh.M., Kondratenko R.M., Krasnova L.V., Toistikov G.A. // Pharmaceutical Chemistry J. 1996. Vol. 30. P. 263.
9. Van Hulle C., Braeckman P., Van-de-Walle M. // Pharmaceutisch Weekblad. 1971. Vol. 106. P. 501.
10. Akao T., Hattori M., Kanaoka M. // Biochemical Pharmacology. 1991. Vol. 41. P. 1025.
11. Katritzky A.R., Nichols D.A., Siskin M., Murugan R., Balasubramanian M. // Chemical Reviews. 2001. Vol. 101. P. 837.
12. Savage P.E. // Chemical Reviews. 1999. Vol. 99. P. 603.
13. Галкин А.А., Лукин В.В. // Успехи химии. 2005. Т. 74. № 1. С. 24.

**Использование «one-pot»-метода для получения
глицирретиновой кислоты из корней солодки в среде субкритической воды**

14. Лекарь А.В., Филонова О.В., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. // Сверхкритические флюиды: Теория и практика. 2012. Т. 7. № 4. С. 4.
 15. Борисенко С.Н., Бичеров А.В., Павлюк О.В., Харабаев Н.Н., Борисенко Н.И., Ветрова Е.В., Минкин В.И., Лекарь А.В. // Сверхкритические флюиды: Теория и практика. 2009. Т. 4. № 2. С. 3.
 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. P. 1801.
 17. Siskin M., Katritzky A.R. // Chem. Rev. 2001. Vol. 101. No. 4. P. 825.
 18. Тихомирова К.С., Лекарь А.В., Борисенко С.Н., Борисенко Н.И., Минкин В.И. // Сверхкритические флюиды: Теория и Практика. 2010. Т. 5. № 2. С. 21.
-
-

**«ONE-POT» TECHNIQUE FOR PRODUCTION OF GLYCYRRHETINIC
ACID FROM THE ROOTS OF LICORICE 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*

For the first time starting from the roots of licorice *Glycyrrhiza glabra* L. the glycyrrhetic acid (GLA) was obtained in a good yield using an «one-pot» method in medium of subcritical water (SBW) that serves as a reactant and a solvent. This method of preparation of GLA allows one to avoid the use of toxic organic solvents and does not require the separate stages of extraction and hydrolysis. The good yields of the targeted GLA can be obtained for the period, which is ten times shorter than needed by the traditional procedures. The proposed method is promising for the future development of low-cost and environment friendly technologies for GLA producing in pharmaceutical, food and cosmetic industries.

Key words: «one-pot», subcritical water, glycyrrhetic acid, roots of licorice *Glycyrrhiza glabra* L.
