

© Коллектив авторов, 2013

О. С. Евсеева, О. А. Андреева, Э. Т. Оганесян

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ГИДРОЛИЗА ГЕСПЕРИДИНА

Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, Россия

Изучены различные гидролизные смеси для расщепления гликозидных связей в гесперидине. Оптимальной системой для полного гидролиза гесперидина с целью получения агликона является система  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9). При изучении кинетики реакции гидролиза гесперидина в указанной системе установлено, что процесс протекает по реакции первого порядка, о чем свидетельствует постоянное значение  $k$ . Установлено, что максимальный выход агликона во времени — 98 % — наблюдается при кипячении реакционной смеси в течение 8,5 ч. Это подтверждает адекватность выбранной нами модели. С целью получения гесперетина-7-О-глюкозида дробный гидролиз целесообразно проводить в системе  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5 - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9).

**Ключевые слова:** гидролиз; гесперидин.

Структурное многообразие и широкое распространение флавоноидных соединений позволило создать на их основе ряд высокоэффективных и безвредных лекарственных препаратов, оказывающих антирадикальное, противовоспалительное, гепатопротекторное, веногонизирующее и другие виды действия [1, 2]. Среди флавоноидных препаратов, применяемых в медицинской практике, следует отметить гесперидин (I) и диосмин (II), которые в различных комбинациях входят в состав многих лечебных и лечебно-профилактических средств [3, 4]. Доступным сырьевым источником для получения I является кожура апельсинов и мандаринов, но в последних его содержание выше [5, 6]. По химической структуре I представляет собой 5,3'-диокси-4'-метокси-7-О-глюкорамнозид флаванона. Индивидуальный I находит широкое применение как венозотропное средство, уменьшает клинические симптомы хронической венозной недостаточности и улучшает тонус вен, лимфатический дренаж, входит в состав целого ряда препаратов, таких как “Детралекс”, “Венарус”, “Целевит”, “Кверцилин”, “Альвитил плюс” и другие [7]. По фармакологической активности агликон I — гесперетин III не уступает исходному дигликозиду [8]. Он широко используется для получения такого важного производного флавоноидов, как диосметин (IV), который является агликоном (II), т.е. 5,3'-дигидрокси-4'-метокси-7-О-рутинозидом флаванона. Следует отметить, что II и IV из-за низкого количественного содержания в растительных объектах экономически выгодно получать окислением I и III.

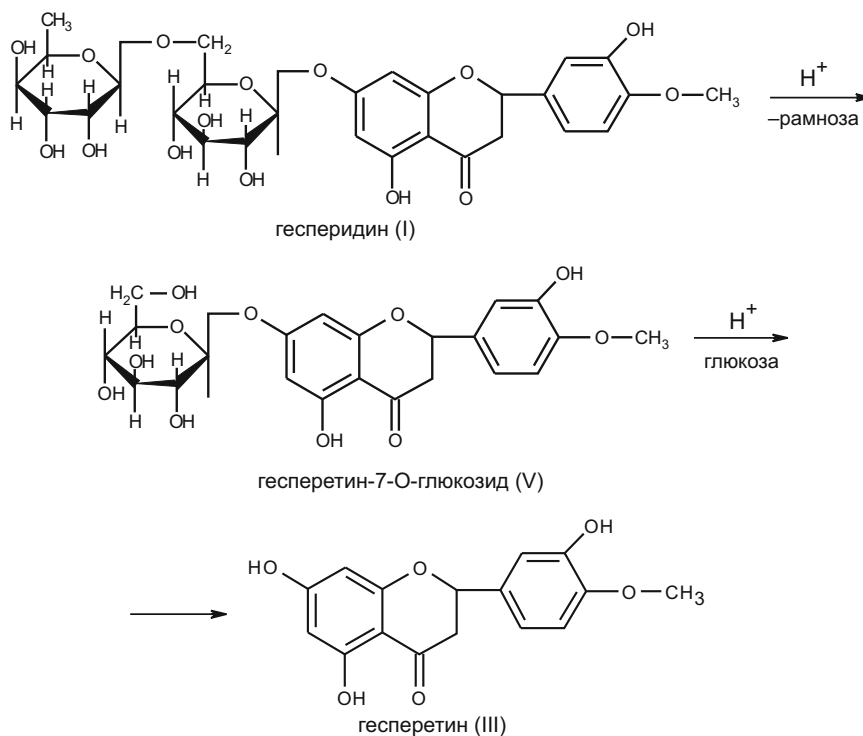
В этой связи целью нашей работы явился поиск оптимального способа гидролиза I, позволяющего повысить выход агликона до теоретически рассчитанного (для дигликозида он составляет 49,5 %), а также полу-

чить промежуточный моногликозид — гесперетин-7-О-глюкозид (V).

Данные литературы, касающиеся условий гидролиза I, разноречивы, поскольку в них предполагается использование различных гидролизных смесей, в среде которых процесс проводят при температуре кипения: 1) смесь Килиани (концентрированная хлороводородная и ледяная уксусная кислоты, 1:1) в течение 6–10 ч; 2) концентрированная хлороводородная кислота — 7 ч; 3) этиленгликоль — 30 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (5:1) — 5 ч [9]. Выход агликона в указанных системах, как правило, низкий, и требуется дополнительная очистка, поскольку целевой продукт частично осмолется из-за деструктивных процессов углеводного фрагмента. В подавляющем большинстве случаев такие способы гидролиза можно использовать исключительно в целях идентификации, но они неудовлетворительны с препаративной точки зрения.

Модификацией кислотного гидролиза является алкоголиз и ацетолиз, которые в ряде случаев имеют преимущества перед обычным гидролизом. Так, ацетолиз (обработка раствором серной кислоты в смеси с уксусной кислотой или уксусным ангидридом) позволяет осуществить дробный гидролиз дигликозидов и биозидов, т.е. получить разные структурные фрагменты. Алкоголиз же протекает в более мягких условиях и в меньшей степени сопровождается побочными процессами.

При поиске оптимальной гидролизной смеси растворителей мы сочли целесообразным использовать в качестве преобладающего растворителя этанол, поскольку образующийся в ходе гидролиза агликон хорошо растворим в данном растворителе, в отличие от исходного I и промежуточного монозида. Более того, ко-



нечный продукт, т.е. агликон, практически не содержит примесей исходного и промежуточного соединений.

Всего нами было исследовано 7 гидролизных систем:

1.  $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:9)
2.  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (2:1:19)
3.  **$\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9)**
4.  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (2:5:15)
5.  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:5:5)
6.  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5 - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9)
7.  $\text{H}_2\text{O} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9)

Ход гидролиза контролировали спектрофотометрически.

На рис. 1 приведены УФ-спектральные кривые для I, V и агликона III.

Спектры поглощения всех 3 компонентов существенно не разнятся (рис. 1). Однако это не мешает проводить спектрофотометрические измерения во времени непосредственно в реакционной смеси, поскольку при охлаждении алиquot гидролизата последовательно выделяется исходный I, затем труднорастворимый монозид V, а агликон остается в растворе. Определение содержания I и промежуточного монозида проводили по калибровочному графику в пересчете на агликон III (рис. 2).

Калибровочный график зависимости оптической плотности при длине волны 289 нм от количества III в исследуемом растворе в пределах концентрации  $0,16 \cdot 10^{-5} - 1,28 \cdot 10^{-5}$  г/мл характеризуется линейной зависимостью, что показано ниже.

Оптимальной оказалась смесь  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9), так как в данном случае наблюдается максимальный выход агликона, равный 98 % (время гидролиза 8,5 ч) (табл. 1).

У флаванон-7-дигликозидов отщепление концевое углеводного остатка проходит легче и, в первую очередь, вследствие того, что гликозидная связь между моносахаридными фрагментами менее устойчива. Таким путем образуется промежуточный моногликозид V. При проведении гидролиза в первых 2 системах растворителей расщепление гликозидной связи идет до стадии образования моногликозида, так как процесс осуществляется в более мягких условиях. При значительном увеличении концентрации серной кислоты (системы 4 и 5) гидролиз доходит до конца, но при этом имеет место осмоление продуктов, а это требует дополнительной очистки III.

Дальнейший анализ проводили в выбранной нами системе  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9) в сочетании с двухмерной хроматографией. Следует обратить

Таблица 1  
Выход продуктов гидролиза I во времени в системе  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9)

| Время, ч | Оптическая плотность ( $\lambda$ -289 нм) | Выход, % |
|----------|---|----------|
| 1,0      | 0,449                                     | 36,0     |
| 2,0      | 0,5625                                    | 45,2     |
| 3,0      | 0,5949                                    | 47,8     |
| 3,5      | 0,6474                                    | 52,0     |
| 4,0      | 0,70195                                   | 56,4     |
| 4,5      | 0,7545                                    | 60,6     |
| 5,0      | 0,8191                                    | 65,8     |
| 5,5      | 0,8433                                    | 67,7     |
| 6,0      | 0,8999                                    | 72,2     |
| 6,5      | 0,9221                                    | 74,0     |
| 7,0      | 1,0151                                    | 81,5     |
| 7,5      | 1,02818                                   | 82,5     |
| 8,0      | 1,12009                                   | 89,9     |
| 8,5      | 1,2574                                    | 98,0     |

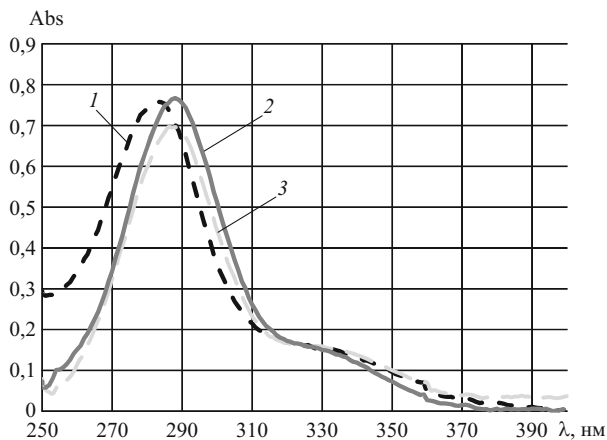


Рис. 1. УФ-спектры поглощения: I (1), V (2), III (3).

внимание на одно важное обстоятельство, которое заключается в том, что, несмотря на кипение гидролизной смеси в течение первых 3,5 ч, исходное вещество полностью не растворяется, и поэтому система остается гетерогенной. Однако спустя еще 0,5 ч гидролизная смесь становится гомогенной, и здесь уже появляется преимущественно моногликозид, максимальный выход которого (65,8 %) наблюдается к 5,0 ч.

Далее представлялось необходимым изучить выход агликона во времени при использовании указанной гидролизной смеси. Для расчета константы гидролиза в данных условиях используют избыток одного реагента относительно другого. Экспериментально фиксируется изменение концентрации вещества, взятого в недостатке, а концентрация вещества, взятого в избытке, практически не меняется. Поэтому содержание избыточного компонента в ходе кинетического эксперимента считают постоянным.

Расчет константы гидролиза  $k$  по уравнению (1) показывает, что зависимость выхода агликона от времени соответствует реакции первого порядка:

$$k = \frac{1}{t} \ln \left( \frac{C_{\text{lim}}}{C_{\text{lim}} - C_i} \right), \quad (1)$$

где  $C_i$  — количество агликона ко времени  $t$ ;  $C_{\text{lim}}$  — предельное количество агликона, образующееся при полном гидролизе данной навески гликозида.

Таблица 2  
Параметры, использованные в корреляционном анализе

| Время ( $t$ ), ч | Расчетное количество агликона ( $C_{\text{lim}}$ ), г | Количество агликона, полученного после гидролиза ( $C_i$ ), г | Константа гидролиза $k$ , рассчитанная по уравнению 1 |
|------------------|---|---|---|
| 6,0              | 0,0495  | 0,0357  | 0,2129  |
| 6,5              | 0,0495  | 0,0366  | 0,2069  |
| 7,0              | 0,0495  | 0,0403  | 0,2404  |
| 7,5              | 0,0495  | 0,0408  | 0,2318  |
| 8,0              | 0,0495  | 0,0445  | 0,2866  |

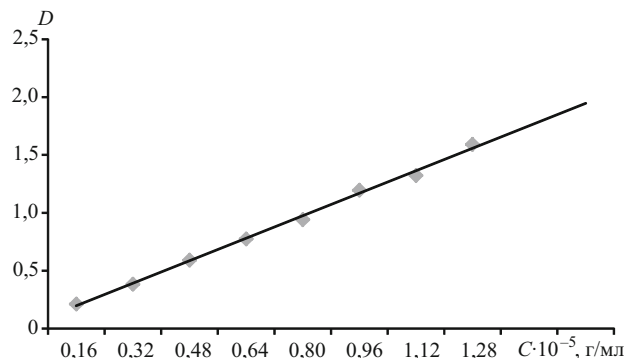


Рис. 2. Градуировочный график стандартного раствора III.

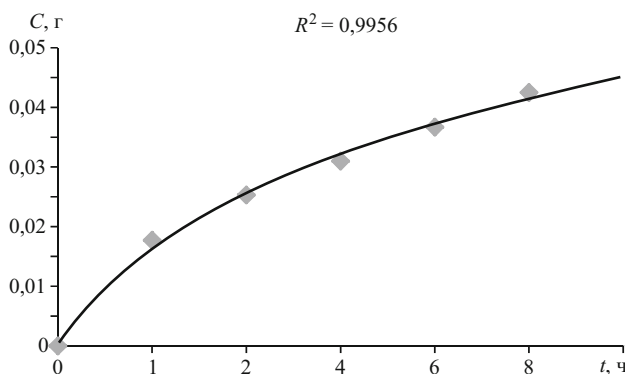


Рис. 3. Зависимость выхода агликона от времени гидролиза.

Постоянство значения  $k$  свидетельствует о том, что реакция гидролиза I является реакцией первого порядка (табл. 2).

Полученные нами экспериментальные данные по кинетике гидролиза были аппроксимированы кинетическим уравнением первого порядка (2):

$$C(t) = C_{\text{lim}}(1 - e^{-kt}). \quad (2)$$

Нелинейная аппроксимационная задача решалась с использованием частных производных по искомым параметрам  $C_{\text{lim}}$  и  $k$ .

Значение найденных параметров ( $C_{\text{lim}} = 0,049439$  и  $k = 0,23464$ ), а также коэффициент корреляции ( $R = 0,995$ ) подтверждают адекватность выбранной нами кинетической модели (рис. 3).

Наличие в гидролизной смеси уксусной кислоты и этанола может привести к образованию этилацетата, поэтому следующим этапом нашей работы было изучение влияния этилацетата на ход гидролиза. С этой целью в гидролизную смесь вместо уксусной кислоты добавлен этилацетат в соотношении  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5 - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9). В течение установленного времени гидролиза наблюдается следующая последовательность процесса. Как было указано выше, гидролизная смесь в течение первых 3,5 ч нагревания остается гетерогенной, а к концу четвертого часа становится гомогенной, и раствор окрашивается в желтый цвет. Хроматографический контроль свидетельствует о том, что наибольшее количество моногликозида образуется

на пятом часу от начала кипения, а затем в реакционной смеси нарастает концентрация агликона. Таким образом для препаративного получения V гидролиз целесообразно проводить в среде  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5 - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9).

#### Экспериментальная часть

**Приготовление гидролизной смеси.** 10 г концентрированной серной кислоты ( $\rho = 1,860$ ) осторожно порциями вливают в 90 г этанола и после тщательного перемешивания добавляют к этой смеси 10 г уксусной кислоты. Для проведения гидролиза берут точную навеску 0,1 г I, переносят в круглодонную колбу с обратным холодильником, добавляют 100 мл гидролизной смеси  $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{H}_2\text{SO}_4-\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9) и нагревают на воздушной бане. Аликвоту из гидролизной смеси по 1 мл берут через каждый час трижды, а затем через каждые 0,5 ч. Для приготовления анализируемых растворов горячую аликвоту гидролизата доводят до метки в мерной колбе на 25 мл гидролизной смесью, фильтруют и измеряют оптическую плотность при 289 нм.

Для построения калибровочного графика зависимости оптической плотности от количества агликона III в растворе точную навеску 0,01 г количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют отмеренные 40 мл смеси  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9), растворяют III, затем доводят до метки  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9).

Для приготовления разведений в мерные колбы на 25 мл переносят аликвоты раствора III и доводят до

метки смесью  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9). Используют аликвоты раствора III, мл: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6. При этом количество III в 25 мл спектрофотометрируемого раствора равно соответственно  $\text{г} \cdot 10^{-5}$ : 0,16; 0,32; 0,48; 0,64; 0,8; 0,96; 1,12; 1,28.

Оптическую плотность измеряют при длине волны 289 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см; в рабочую кювету помещают спектрофотометрируемые растворы, в кювету сравнения — смесь  $\text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1:1:9).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. E. Middleton, *Int. J. Pharmacognosy*, **439**, 175 – 182 (1996).
2. А. С. Сараф, Э. Т. Оганесян, *Хим.-фарм. журн.*, **25**(2), 4 – 8 (1991).
3. Д. Ю. Корулькин, *Природные флавоноиды*, Рос. акад. наук, Сиб. отд., Новосиб. Ин-т органической химии, Академическое изд-во “Гео”, Новосибирск (2007), сс. 191 – 220.
4. T. Brasseur, *Pharm. Belg.*, **44**(6), 403 – 410 (1989).
5. O. Benavente-Garcia, J. Castillo, F. R. Marin, et al., *Agr. Food Chem.*, **45**(12), 4506 – 4514 (1997).
6. B. S. G. Winkel, *The Science of Flavonoids*, Columbus Ohio 43210, 47 – 71 (2006).
7. *Лекарственные препараты зарубежных фирм в России*, АстраФармсервис, Москва (1993).
8. J. Cha, Y. Cho, *Hanguk Nonghwa Hakhoechi*, **40**(6), 577 – 582 (1997).
9. I. Nouya, A. Shigeru, O. Yoshishico, et al., *Carbohydratis*, **43**(11), 1212 – 1218 (1996).
10. F. Smith, H. C. Srivastava, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1404 (1956).

Поступила 20.05.13

## STUDYING THE PROCESS OF HESPERIDIN HYDROLYSIS

O. S. Evseva<sup>1</sup>, O. A. Andreeva<sup>2</sup>, and E. T. Oganessian<sup>1</sup>

Pyatigorsk State Medico-Pharmaceutical Institute, Division of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, 357532 Russia

We have studied various hydrolysis media for splitting glycoside bonds in hesperidin. An optimum system for the complete hydrolysis of hesperidin to aglycone is the  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5 - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1 : 1 : 9) mixture. Investigation of the hydrolysis kinetics showed that the process is described by a first-order reaction, which is evidenced by a constant value of  $k$ . The maximum yield of aglycone (98%) is observed upon boiling the reaction mixture for 8.5 h. This result confirms the validity of a selected reaction model. For obtaining hesperetin-7-O-glucoside, it is also expedient to carry out reaction in the  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5 - \text{H}_2\text{SO}_4 - \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (1 : 1 : 9) system.

**Key words:** hesperidin; hydrolysis