

© Коллектив авторов, 2017

В. А. Бабкин, Л. А. Остроухова, А. А. Левчук, Н. А. Онучина

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ВЫХОД НАТИВНОГО ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА, СОДЕРЖАЩЕГО БОЛЕЕ 97 % (+)-2*R*,3*R*-транс-ИЗОМЕРА

ФГБУН Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, Россия, 664033, Иркутск, Фаворского, 1; e-mail: babkin@irioch.irk.ru

Определены оптимальные параметры процесса выделения изомера дигидрокверцетина (ДКВ), обладающего наибольшей антиоксидантной активностью. Показано, что этилацетат в качестве экстрагента в данном процессе имеет неоспоримые преимущества перед другими, используемыми в промышленности, растворителями. Предложен оптимальный метод выделения ДКВ из древесины лиственницы с высоким выходом продукта с большим энантиомерным избытком. Разработана методика и проведен анализ количественного содержания (+)-2*R*,3*R*-изомера ДКВ, выделяемого из древесины лиственницы *Larix Sibirica* Ledeb.

Ключевые слова: дигидрокверцетин; стереоизомеры; энантиомеры; хиральность; древесина лиственницы; экстракция.

Интерес к разработке новых и оптимизации существующих стереохимически чистых препаратов в медицине вызван жесткими требованиями, выдвигаемыми в настоящее время к стереоизомерам лекарственных средств. Известно, что многие синтетические и природные медицинские препараты существуют в виде 2 или более пространственных изомеров, отличающихся своим биологическим действием. Фармацевтическая промышленность, уходя от производства рацематов, акцентирует своё внимание на развитии хирально чистых *S*- или *R*-стереоизомеров лекарственных препаратов с максимальным индексом терапевтической эффективности [1, 2].

Выпускаемые в настоящее время промышленные образцы дигидрокверцетина (ДКВ) отличаются по некоторым физико-химическим параметрам, несмотря на то, что сырье для их производства используется одно и то же — древесина лиственницы. Различия в характеристиках производимых образцов ДКВ можно объяснить разными технологическими условиями их производства: различные параметры процесса (температура, давление, время и т.д.), также немалую роль играет использование разных растворителей для экстракции, очистки и кристаллизации. Любой параметр

технологического процесса, особенно применение водного или безводного растворителя, может повлиять на получение продукта с разным количественным составом оптических изомеров. Соответственно, производимые образцы обладают разным уровнем антиоксидантной активности [3].

Из приведенных в табл. 1 данных видно, что антиоксидантная активность ДКВ зависит не только и не столько от чистоты производимого продукта, но и от применяемого растворителя и технологии его получения.

Молекула ДКВ содержит 2 ассиметрических атома углерода — С-2 и С-3, следовательно, существует в виде 4 энантиомеров (2 пар стереоизомеров). Основным природным изомером является *транс* (+)-2*R*,3*R*-изомер ДКВ. Известно, что именно эти природные изомеры обладают наибольшей биологической активностью (рис. 1).

Описанные в литературе способы экстракции не делают акцента на количественном содержании изомеров получаемого ДКВ. Известны способы экстракции ядровой древесины спиртовыми растворами с последующей очисткой от смолистых веществ неполярными растворителями (гексан, бензин) [4], экстракция

Таблица 1

Характеристика антиоксидантной активности (ORAC) образцов ДКВ, полученных по разным технологиям [3]

Образец ДКВ, производитель	Используемый экстрагент	Содержание ДКВ, % от абсолютно сухой древесины	ORAC (μмоль тролокс/г)*
ООО “Химия древесины”, Иркутск	Этилацетат	92 ± 1	32743
ЗАО “АМЕТИС”, Благовещенск	Водный этанол — третбутиловый эфир	89 ± 1	15155
ЗАО НПФ “ФЛАВИТ”, Пущино	Этиловый спирт (кавитационное поле)	94 ± 1	23000
Таксифолин (синоним ДКВ) каталог Sigma Aldrich	Этиловый спирт	97 ± 1	11790

* (“Oxygen Radical Absorption Capacity”-ORAC), см. экспериментальную часть; тролокс — водорастворимый аналог витамина Е.

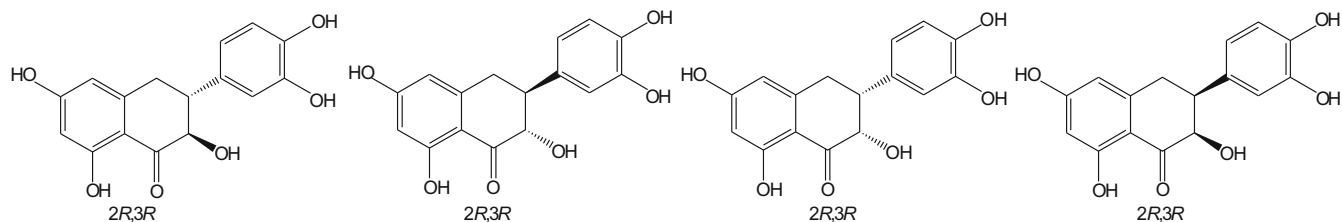


Рис. 1. Структурные формулы изомеров дигидрокверцетина.

спиртоэфирной фазой с дальнейшим растворением сухого экстракта в ацетоне [5].

Цель работы — обоснование метода получения нативного дигидрокверцетина, содержащего более 97 % (+)-2*R*,3*R*-транс-изомера от общего количества выделенного ДКВ.

Задача настоящего исследования — анализ количественного содержания (+)-2*R*,3*R*-изомера ДКВ в образцах, выделенных из одного сырьевого объекта (ядровая часть древесины лиственницы *Larix Sibirica* Ledeb.), при различных условиях экстракции.

Экспериментальная часть

Извлечение флавоноидов проводят экстракцией опилок органическим растворителем с последующим выделением их из экстракта по способу [6]. Исчерпывающую экстракцию осуществляют при соотношении сырья — растворитель (гидромуль) 1:10 при температуре кипения растворителя в течение 3 ч с нагреванием или в течение 6 ч при комнатной температуре. Экстракт отфильтровывают, упаривают досуха и определяют в нем содержание флавоноидов в пересчете на ДКВ. Содержание последнего в экстракте составляло 82 % от веса сухого экстракта. Далее экстракт перекристаллизовывают из горячей воды и получают продукт со следующими характеристиками: влажность 7,2 %, т. пл. 223 °С, содержание ДКВ 94,5 %, примеси (по данным ВЭЖХ): дигидрокемпферол 4,1 %, эриодиктиол 1,1 %, нарингенин — следы. УФ-спектр спиртового раствора полученного образца в области длин волн от 230 до 380 нм имеет полосу поглощения с максимумом при (290 ± 2) нм, минимумом при (250 ± 2) нм, плечо при (327 ± 2) нм.

Исследования антиоксидантной активности, основанные на методе определения адсорбционной ёмкости по отношению к кислородным радикалам (“Oxygen Radical Absorption Capacity”-ORAC), выполнены в лаборатории ABC Testing (Advanced Botanical Consulting & Testing, INC.), США, с применением метода AUV201A [7].

Для проведения экспериментальных исследований разработаны методики количественного определения ДКВ и его основного изомера (+)-(2*R*,3*R*)-дигидрокверцетина.

Анализ ВЭЖХ образца, полученного из древесины ДКВ, проводили в следующих условиях: хроматографическая система Agilent 1260 (США) с УФ-детектором и обращенно-фазной колонкой Zorbax SB C₁₈ 5 мкм, 250 × 4,6 мм. Идентификацию отдельных пиков

на хроматограммах проводили по временам удерживания, УФ-спектрам и кохроматографией с аутентичными образцами, система раствор ацетонитрила в 2 % уксусной кислоте (1:3, об.). В качестве внешнего стандарта использовали государственный стандартный образец (ГСО) дигидрокверцетина (ФС 42-3853-99).

Процедура анализа. Около 0,01 г препарата ДКВ (с точностью 0,0005 г), предварительно высушенного при температуре 105 °С до постоянной массы, растворяют в приготовленном растворе подвижной фазы с получением концентрации 1 мг в 1 мл. К 0,5 мл полученного раствора прибавляют 4,5 мл подвижной фазы (разбавление в 10 раз) и вводят образец в колонку прибора (петля 20 мкл).

Аналитическая длина волны	290 нм
Скорость потока подвижной фазы	1,3 мл/мин
Время записи хроматограммы	13 мин

Площади пиков на хроматограммах определяют с помощью электронного интегратора. В этих же условиях параллельно проводят хроматографирование аналогично приготовленного раствора стандартного образца (СО) дигидрокверцетина (концентрация 1 мг в 1 мл). Количественное содержание ДКВ рассчитывают по отношению площадей пика СО и исследуемого образца.

Анализ и разделение энантиомеров ДКВ проводят в условиях ВЭЖХ на обращенно-фазной колонке Cartridge 250-4 ChiraDex (5μ) с хиральным наполнителем в системе ацетонитрил / 0,5 % ортофосфорная кислота (3:17) на УФ-детекторе системы Agilent 1260. В качестве стандарта используют образец — (+)-(2*R*,3*R*) дигидрокверцетина (фирма ДИОД, Москва), выделенный препаративной хроматографией. Доказательство строения изомера приведено в работе [8].

Порядок выхода из колонки изомеров ДКВ следующий: **1** (+)-2*S*,3*R* (*цис*) – 0,467 %; **2** (–)-2*S*,3*S* (*транс*) – 0,109 %; **3** (+)-2*R*,3*R* (*транс*) – 96,816 %; **4** (–)-2*R*,3*S* (*цис*) – 2,608 %.

Проведена квалификация (валидация) разработанной методики ВЭЖХ для количественного определения ДКВ и его трансизомера (+)-2*R*,3*R*. Метрологическая оценка показала, что относительная ошибка методики с доверительной вероятностью 95 % не превышает ± 5 %, то есть находится в пределах случайной ошибки.

Проведенная квалификация по прецизионности, правильности и линейности показала, что использованная методика является высокочувствительной, правильной и воспроизводимой [9].

Выход ДКВ и его характеристика в различных условиях экстракции

Растворитель	Температура экстракции *, °С	Выход ДКВ, % от абсолютно сухой древесины	Содержание (+)-2R,3R-изомера, от общего количества ДКВ, %
Этилацетат	77	1,15 ± 0,05	98 ± 1
	22	1,1 ± 0,05	96 ± 1
Водный этанол (70 %)	80	0,8 ± 0,05	85 ± 1
	22	0,85 ± 0,058	90 ± 1
Ацетон	56	1,2 ± 0,05	91 ± 1
	22	1,15 ± 0,05	92 ± 1

* Время экстракции при нагревании 3 ч, без нагревания — 6 ч.

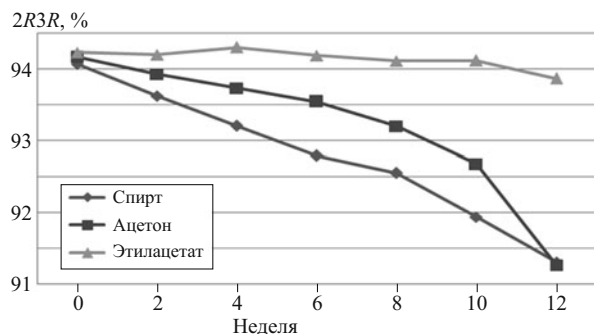


Рис. 2. Изменение количественного содержания (+)-2R,3R-изомера ДКВ в растворах разных растворителей в зависимости от времени хранения.

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что содержание искомого изомера ДКВ в экстрактах, полученных с использованием в качестве экстрагента этилацетата, наибольшее и достигает 99 % от общего выхода ДКВ, в то время как ацетоновые и спиртовые экстракты имеют значительно более низкие показатели (табл. 2).

Параллельно изучено влияние растворителя на изменение энантиомерного состава ДКВ от времени его хранения в разных растворителях: этиловом спирте, ацетоне и этилацетате (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что ДКВ при нахождении в растворе этилацетата в течение 3 мес не обнаруживает изменения в энантиомерном составе. Однако при хранении вещества в ацетоне или в этиловом спирте происходит снижение содержания (+)-2R,3R-изомера, что наблюдается с первого дня хранения. Процесс рацемизации ДКВ в спиртовом растворе отмечен ранее и другими исследователями [7].

Таким образом, разработанная в лаборатории химии древесины ИрИХ СО РАН технология с использованием в качестве экстрагента этилацетата позволяет защитить искомым продукт от рацемизации и получить не менее 97 % трансизомера (+)-2R,3R-дигидрокверцетина от общего количества, выделенного в процессе экстракции ДКВ. Это значительно повышает биологическую активность производимого продукта. Исследование показало, что этилацетат в качестве экстрагента в данном процессе имеет неоспоримые пре-

имущества перед другими, используемыми в промышленности, растворителями. На основе этих данных разработан промышленный технологический регламент производства ДКВ из древесины лиственницы с высоким выходом продукта с большим энантиомерным избытком.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. Г. Воронков, *Здоровье Украины*, № 1, 31 – 32 (2007).
2. А. В. Бабушкина, *Укр. мед. ж.*, № 5, 33 – 39 (2009).
3. В. А. Бабкин, Л. А. Остроухова, Н. Н. Трофимова, *Биомасса лиственницы: от химического состава до инновационных продуктов*, Новосибирск (2011), с. 73.
4. С. А. Лашин, В. С. Остронков, Патент РФ № 2330677, *Бюл. изобрет.*, № 22 (2008).
5. А. А. Уминский, Патент РФ № 2165416, *Бюл. изобрет.*, № 5 (2001).
6. В. А. Бабкин, Л. А. Остроухова, Д. В. Бабкин, Ю. А. Малков, Патент РФ № 2158598, *Бюл. изобрет.*, № 31 (2000).
7. Boxin Ou, Maureen Hampsch-Woodill, and Ronald L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4619 – 4626 (2001).
8. И. Г. Зенкевич, А. Ю. Ещенко, В. Г. Макаров и др., *Материалы X Международного съезда ФИТОФАРМ*, Санкт-Петербург (2006), сс. 93 – 106.
9. Государственный стандарт Российской Федерации. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. ГОСТ Р ИСО 5725-1-(2002).

Поступила 29.12.15

INFLUENCE OF EXTRACTION CONDITIONS ON THE YIELD OF NATIVE DIHYDROQUERCETIN CONTAINING MORE THAN 97% OF (+)-2R,3R-TRANS ISOMER

V. A. Babkin*, L. A. Ostroukhova, A. A. Levchuk, and N. A. Onuchina

A. E. Favorsky Institute of Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia.

* e-mail: babkin@irioch.irk.ru

Optimum parameters for the extraction process of dihydroquercetin (DHQ) isomer possessing maximum biological activity have been determined. Ethyl acetate as extractant for this process is most advantageous over other industrial solvents. The optimum method of DHQ extraction from larch wood with high yield of predominantly single DHQ enantiomer is proposed. A protocol for obtaining +2R,3R-trans isomer of DHQ extracted from the wood of larch (*Larix Sibirica* Ledeb) has been developed and a method for its quantitative analysis have been elaborated.

Keywords: dihydroquercetin; stereo isomers; enantiomers; chirality; larch wood; extraction.