

С. Л. Аджиахметова (к.фармацевт.н., доц.), Д. И. Поздняков (к.фармацевт.н., доц., зав.каф.),
Н. М. Дибизева (к.фармацевт.н., доц.), Э. Т. Оганесян (д.фармацевт.н., проф., зав.каф.)

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ГИДРОЛИЗА ИКАРИИНА

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Волгоградского государственного
медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации,
кафедра органической химии
357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11; e-mail: similla503@mail.ru

S. L. Adzhiakhmetova, D. I. Pozdnyakov, N. M. Dibizheva, E. T. Oganessian

STUDY OF THE PROCESS OF ICARIIN HYDROLYSIS

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch of Volgograd State Medical University
11, Prospekt Kalinina Str., Pyatigorsk, 357532, Russia; e-mail: similla503@mail.ru

С целью получения моногликозида и агликона из икариина проводили ступенчатый гидролиз, используя две системы растворителей: $\text{H}_2\text{SO}_4\text{--C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:9) и $\text{CH}_3\text{COOH--H}_2\text{SO}_4\text{--C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:1:9). Ход гидролиза контролировали бумажной хроматографией. Наилучшее разделение продуктов гидролиза наблюдали при использовании системы элюентов: кислота уксусная–кислота хлористоводородная–вода (5:1:5). Хроматографический контроль свидетельствует, что наибольшее количество моногликозида – икаризид I образуется на втором часу кипения гидролизной смеси, а затем в реакционной смеси нарастает концентрация агликона – икаритина. Оптимальной для гидролиза оказалась система $\text{H}_2\text{SO}_4\text{--C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:9), где выход агликона составил 96%, поэтому дальнейшее препаративное выделение веществ проводили в этой системе. После окончания гидролиза образовавшиеся продукты икаризид I и икаритин были выделены из реакционной смеси экстракцией диэтиловым эфиром. Полученные вещества идентифицированы методом бумажной хроматографии, данными спектроскопии в УФ, ИК-областях, измерением температур плавления и пробой смешения с достоверными образцами, где не наблюдалась депрессия температуры плавления.

Ключевые слова: икаризид I; икариин; икаритин; лекарствовоподобие; ступенчатый гидролиз.

Одним из основных действующих веществ горянки (*Epimedium*) является флавоноид икариин^{1–4}. В традиционной китайской медицине было доказано, что экстракты из растений рода *Epimedium* L. обладают эстрогенным свойством и эффективностью при остеопорозе^{5,6}.

В работе¹ установлено, что икариин обладает мощными антидепрессантными свойствами, которые опосредованы нейрехимическими и нейро-эндокринными системами.

Дата поступления 28.01.23

In order to obtain monoglycoside and aglycone from icariin, stepwise hydrolysis was carried out using two solvent systems: $\text{H}_2\text{SO}_4\text{--C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:9) and $\text{CH}_3\text{COOH--H}_2\text{SO}_4\text{--C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:1:9). The progress of hydrolysis was monitored by paper chromatography. The best separation of hydrolysis products was observed when using the eluent system: acetic acid–hydrochloric acid–water (5:1:5). Chromatographic control indicates that the largest amount of monoglycoside, icariside I, is formed in the second hour of boiling of the hydrolysis mixture, and then the concentration of the aglycone, icaritin, increases in the reaction mixture. The system $\text{H}_2\text{SO}_4\text{--C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:9) turned out to be optimal for hydrolysis, where the yield of aglycone was 96%, so further preparative isolation of substances was carried out in this system. After completion of hydrolysis, the resulting products icariside I and icaritin were isolated from the reaction mixture by extraction with diethyl ether. The obtained substances were identified by paper chromatography, spectroscopy data in the UV, IR regions, measurement of melting points and mixing tests with reliable samples where no depression of the melting point was observed.

Key words: drug-like; icariin; icariside I; icaritin; stepwise hydrolysis.

Помимо долгосрочного воздействия на экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота eNOS, икариин также усиливает выработку биоактивного NO в краткосрочной перспективе (после 5-минутной инкубации, $P<0.05$). В сочетании с другими эффектами защитное действие икариина на эндотелиальные клетки может способствовать защитному действию на сердечно-сосудистую систему².

В работе³ показано, что икариин и его агликон икаритин с пренильной группой обладает селективной активностью по модуляции рецепто-

ров эстрогена. Установлена противораковая эффективность икаритина *in vitro*, избирательно опосредованной индукцией останковки клеточного цикла, но не связанной с рецепторами эстрогена в клетках положительная по рецептору эстрогена.

Икаритин применяют для получения лекарственных средств, предназначенных для предотвращения заболеваний, связанных с нарушением системы гемостаза⁷.

В 2021 году было проведено открытое исследование действия икаритина у пациентов с прогрессирующей гепатоцеллюлярной карциномой. Установлено, что икаритин обладает низкой токсичностью, переносимостью и может ингибировать рост раковых клеток гепатоцеллюлярной карциномой как *in vitro*, так и *in vivo*⁸.

Нами осуществлен анализ на соответствие гликозида икариина и его агликона критериям лекарствовоподобия в соответствии с «правилом пяти» Липински, правилам Ghose, Veber, Egan и Muegge при помощи веб-сервиса SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>). Полученные данные свидетельствуют, что гликозид не соответствует перечисленным критериям, а агликон характеризуется высокой степенью лекарствовоподобия, так как соответствует всем требованиям пяти правил и может обладать выраженной фармакологической активностью⁹.

В связи с вышесказанным целью работы явилось изучение процесса ступенчатого гидролиза икариина с целью препаративного получения моногликозида (икаризиды I) и агликона – икаритина.

Материалы и методы исследования

Для исследований использовали субстанцию икариина (фирма-изготовитель *Hunan warrant pharmaceuticals*).

Гидролиз гликозида в 20%-ной серной кислоте.

Для получения агликона икаритина около 2.0 г гликозида растворяли в 20 мл воды, очищенной при нагревании, и к исходному раствору добавляли 20 мл 20%-ной серной кислоты. Далее гидролизную смесь нагревали 4 ч на водяной бане в круглодонной колбе емкостью 250 мл с обратным холодильником. По истечении времени смесь охлаждали, переносили в делительную воронку и проводили экстракцию агликона небольшими порциями диэтилового эфира. Эфирные извлечения объединяли, растворитель удаляли полностью. Полученное вещество трижды перекристаллизовывали из спирта¹⁰.

Гидролиз гликозида проводили в двух системах растворителей I – $\text{H}_2\text{SO}_4\text{--C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:9) и II – $\text{CH}_3\text{COOH--H}_2\text{SO}_4\text{--C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:1:9)¹¹.

С целью выбора оптимальной гидролизной системы для препаративного получения моногликозида и агликона по 0.05 г икариина переносили в две круглодонные колбы с обратным холодильником, в каждую их них добавляли по 100 мл гидролизной смеси I или II и нагревали на воздушной бане. Через каждый час из реакционной смеси отбирали по 1 мл горячей аликвоты гидролизата и доводили до метки в мерной колбе на 25 мл соответствующей гидролизной смесью I или II, затем измеряли оптическую плотность¹¹.

Для выделения икаризида I и икаритина около 2.0 г акариина растворяли в системе I с последующим нагреванием в течение 2 или 10 ч, соответственно. Продукт гидролиза выделяли из гидролизата экстракцией диэтиловым эфиром. Полученные вещества трижды перекристаллизовывали из спирта.

Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика зависимости оптической плотности от количества агликона икаритина в растворе точную навеску 0.01 г количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли отмеренные 40 мл гидролизной смеси I или II, растворяли, затем доводили до метки гидролизной смесью I или II.

Для приготовления разведений аликвоты (0.8; 1.0; 1.2; 1.4; 1.6; 1.8; 2.0 мл) переносили в мерные колбы на 25 мл и доводили гидролизной смесью. При этом количество икаритина в 25 мл спектрофотометрируемого раствора равно соответственно 0.64; 0.80; 0.96; 1.12; 1.28; 1.44; $1.60 \cdot 10^{-5}$ г/мл. Оптическую плотность измеряли при длине волны 270 нм.

Обнаружение углеводного компонента

Углеводный компонент определяли в гидролизате после нейтрализации карбонатом бария до нейтральной реакции, затем фильтровали и упаривали до небольшого остатка. Остаток анализировали методом бумажной хроматографии в присутствии достоверных образцов моносахаридов. В качестве подвижной фазы использовали систему растворителей БУВ (4:1:5); неподвижной – бумагу FN7 (Германия). Проявляли анилинфталатным реактивом.

Физико-химические характеристики

Для подтверждения полученных после проведенного гидролиза продуктов использовали бумажную хроматографию (БХ) в системах растворителей: 15% CH_3COOH ; 30% CH_3COOH ; БУВ (4:1:5) и систему Форестал: кислота уксусная–кислота хлористоводородная–вода (5:1:5).

Температуру плавления для исследуемых соединений определяли на аппарате SMP30. УФ-спектры поглощения спиртовых растворов регистрировали на спектрофотометре СФ-102 в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм, ИК-спектры –

на Фурье-спектрометре ФСМ 1201 в диапазоне 4000–500 см⁻¹ измеряли в таблетках КВг.

Результаты и обсуждение

Гидролиз гликозида икариина в 20%-ной серной кислоте

Процесс гидролиза гликозида подтверждали методом БХ в системе Форестал: кислота уксусная–кислота хлористоводородная–вода (5:1:5), коэффициенты подвижности для икариина и его агликаона – икаритина составили 0.94 ± 0.02 и 0.56 ± 0.02 , соответственно. Получили порошок желтого цвета.

После нейтрализации гидролизата карбонатом бария обнаружены глюкоза и рамноза. Коэффициенты подвижности глюкозы и рамнозы при использовании системы элюентов БУВ (4:1:5) и составляет 0.15 и 0.41, соответственно.

Выход агликаона в указанной системе низкий (45.3%), что связано с очень плохой растворимостью в воде и частичным его осмолением из-за деструктивных процессов с углеводным фрагментом, вследствие чего продукт гидролиза загрязнен и требует дополнительной очистки.

Следует отметить, что такую систему можно использовать исключительно в целях идентификации агликаона, но получать в препаративных целях моногликозид – икаризид I и икаритин невозможно.

Гидролиз гликозида в системах растворителей I – H₂SO₄–C₂H₅OH (1:9) и II – CH₃COOH–H₂SO₄–C₂H₅OH (1:1:9).

Ранее была предложена модификация гидролизной смеси, которая заключается в том, чтобы в качестве преобладающего растворителя использовать этанол¹¹.

Исследуемые нами соединения растворимы в этаноле. Для определения системы растворителей с целью препаративного получения моногликозида и агликаона гидролиз проводили, используя 2 системы растворителей: H₂SO₄–C₂H₅OH (1:9) и CH₃COOH–H₂SO₄–C₂H₅OH (1:1:9).

Ход гидролиза контролировали БХ. Наилучшее разделение наблюдали при использовании системы элюентов: кислота уксусная–кислота хлористоводородная–вода (5:1:5). Коэффициенты подвижности для икариина, икаризид I, икаритина составляют 0.93 ± 0.02 ; 0.76 ± 0.03 ; 0.57 ± 0.02 , соответственно.

Хроматографический контроль свидетельствует, что наибольшее количество моногликозида образуется на втором часу кипения гидролизной смеси, а затем в реакционной смеси нарастает концентрация агликаона.

На рис. 1 приведена схема дробного гидролиза икариина (7-(β-D-глюкопиранозилокси)-5-гидрокси-4'-метокси-8-(3-метилбут-2-ен-1-ил)-3-(α-L-рамнопиранозилокси)флавоноид) до моногликозида (икаризид I) и агликаона – икаритина.

Общеизвестно, что 3-гликозиды флавонолов в кислой среде при кратковременном нагревании легко гидролизуются¹², поэтому полное расщепление α-гликозидной связи в икариине протекает в течение 1.5–2 ч. По положению C-7 гидролиз протекает при более длительном нагревании.

Калибровочный график зависимости оптической плотности при длине волны 270 нм от количества икаритина в исследуемом растворе в пределах концентрации $0.64 \cdot 10^{-5}$ – $1.6 \cdot 10^{-5}$ г/мл характеризуется линейной зависимостью (рис. 2).

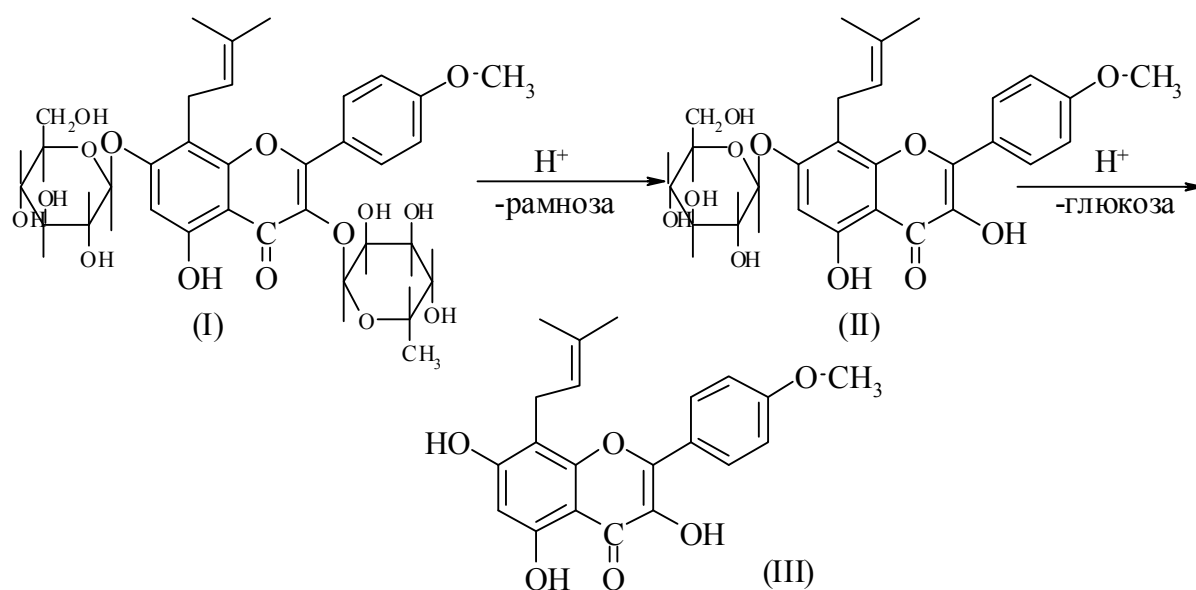


Рис. 1. Схема гидролиза икариина: I – икарин; II – икаризид I; III – икаритин

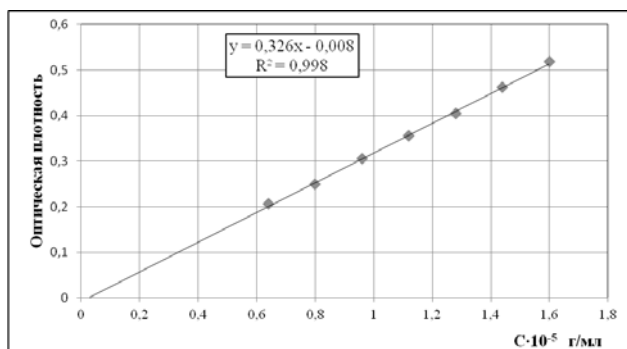


Рис. 2. Градуировочный график (система I)

Содержание икариина и промежуточного моногликозида определяли по калибровочному графику в пересчете на агликон – икаритин.

Оптимальной оказалась система I, так как выход составил 96.0% (табл.1), поэтому препаративное выделение веществ целесообразно проводить в этой системе. После гидролиза икаризид I и икаритин были выделены из гидролизатов диэтиловым эфиром. УФ-спектры исследуемых соединений представлены на рис. 3.

Икариин. Светло-коричневый порошок. $T_{пл.}$ 228–230 °С. УФ-спектр (этиловый спирт), λ_{max} , нм: 271, 319. ИК-спектр, ν , см⁻¹: 3312.7 (ОН), 2873.9 (–О–CH₃), 1655.3 (C=O), 1560.5 (C=C).

Икаризид I. Темно-желтый порошок. Выход: 68.2%. $T_{пл.}$ 230–231 °С. УФ-спектр (этиловый спирт), λ_{max} , нм: 273, 328, 373. ИК-спектр, ν , см⁻¹: 3353.1 (ОН), 2862.1 (–О–CH₃), 1646.5 (C=O), 1602.0 (C=C).

Икаритин. Желтый порошок. Выход: 50.3%. $T_{пл.}$ 236–238 °С. УФ-спектр (этиловый спирт), λ_{max} , нм: 270, 371. ИК-спектр, ν , см⁻¹: 3311.7 (ОН), 2859.1 (–О–CH₃), 1658.2 (C=O), 1619.8 (C=C).

Проба смешения полученных продуктов с достоверными образцами не дает депрессию температуры плавления¹³.

Полученные вещества были идентифицированы методом БХ, данными УФ, ИК, измерением температур плавления и пробой смешения с достоверными образцами, где не наблюдалась депрессия температуры плавления.

Таблица 1

**Результаты гидролиза в системах
H₂SO₄–C₂H₅OH (1:9) и CH₃COOH–H₂SO₄–C₂H₅OH (1:1:9)**

Система растворителей	H ₂ SO ₄ –C ₂ H ₅ OH (1:9)		CH ₃ COOH–H ₂ SO ₄ –C ₂ H ₅ OH (1:1:9)	
Время, ч	Оптическая плотность (270 нм)	Выход, %	Оптическая плотность (270 нм)	Выход, %
1	0.650	50.0	0.488	37.7
2	0.829	63.6	0.563	43.4
3	0.745	57.2	0.821	63.0
4	0.788	60.5	0.606	46.7
5	0.824	63.2	0.632	48.6
6	0.890	68.2	0.720	55.3
7	0.984	75.4	0.894	68.5
8	1.047	80.2	0.904	69.3
9	1.139	87.2	0.980	75.1
10	1.256	96.0	1.057	80.9

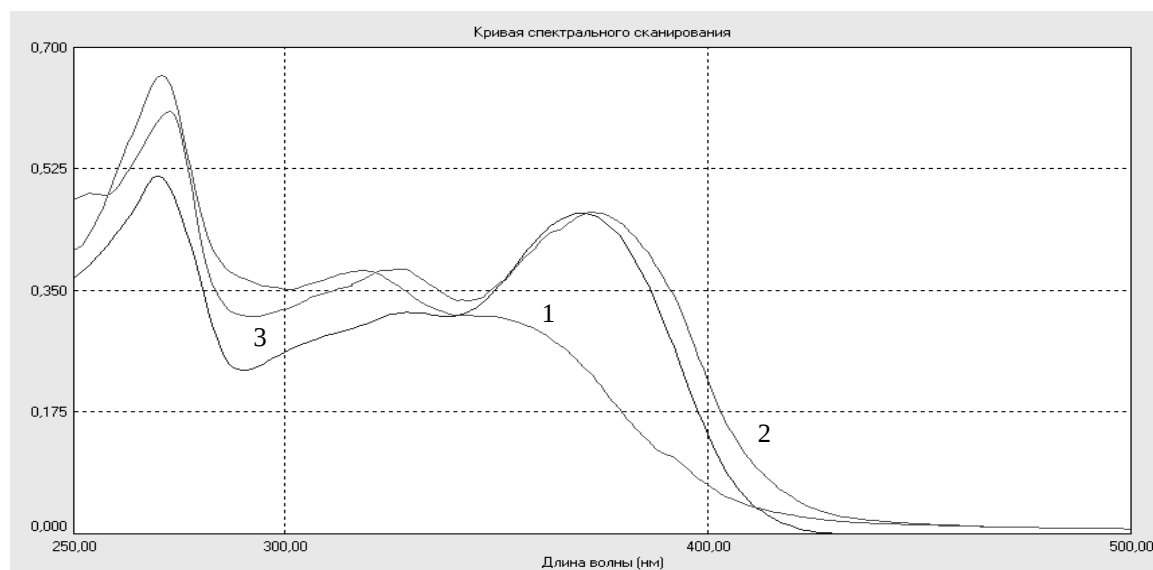


Рис. 3. УФ-спектры поглощения икариина (1), икаризид I (2), икаритина (3)

Литература

1. Pan Y., Kong L., Xia X., Zhang W., Xia Z., Jiang F. Antidepressant-like effect of icariin and its possible mechanism in mice // *Pharmacol. Biochem. Behav.*– 2005.– V.82, №4.– Pp.686-694.
2. Xu H.-B., Huang Z.-Q. Icariin enhances endothelial nitricoxide synthase expression on human endothelial cells *in vitro* // *Vasc. Pharm.*– 2007.– V.47, №1.– Pp.18-24.
3. Huang X., Zhu D.Y., Lou Y.J. A novel anticancer agent, icaritin, induced cell growth inhibition, G₁ arrest and mitochondrial transmembrane potential drop in human prostate carcinoma PC-3 cells // *Eur. J. Pharmacol.*– 2007.– V.564, №1-3.– Pp.26-36.
4. Шевлякова О.А., Васильев К.Ю., Ихалайнен А.А., Антохин А.М., Таранченко В.Ф., Гончаров В.М., Аксенов А.В., Митрофанов Д.А., Родин И.А., Шпигун О.А. Определение икариина в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масспектрометрией // *Аналитика и контроль.*– 2015.– Т.19, №4.– С.316-322.
5. Shen P., Guo B.L., Gong Y., Hong Deborah Y.Q., Hong Y., Yong E.L. Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of Epimedium species // *Phytochemistry.*– 2007.– V.68, №10.– Pp.1448-1458.
6. Ma H.P., He X., Yang Y., Li M., Hao D., Jia Z. The genus Epimedium: an ethnopharmacological and phytochemical review // *J. Ethnopharmacol.*– 2011.– V.134, №3.– Pp.519-541.
7. Патент №2022125738 РФ. Применение икаритина для получения лекарственных средств / Чжан Г., Яо Ц., Сунь Ч., Ли Б. Пань С. // Б.И. – 2023. – №30.
8. <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01972672>
9. Горишний В.Я., Матийчук В.С. Синтез, физико-химические свойства, биоподобие и противоопухолевая активность эфиров и амидов 2-[5-(4-бромбензилиден)-4-оксо-2-тиоксотиазолидин-3-ил]-3-метилбутановой кислоты // *ЖОрХ.*– 2021.– Т.57, №1.– С.35-42.
10. Поздняков Д.И., Аджирахметова С.Л., Червонная Н.М., Оганесян Э.Т. Химическая модификация ex planta флавоноида флоридзина реакцией оксимирования и оценка его нейропротекторной активности // *Баш. хим. ж.*– 2023.– Т.30, №4.– С.17-21.
11. Евсеева О.С., Андреева О.А., Оганесян Э.Т. Исследование процесса гидролиза гесперидина // *Химико-фармацевтический журнал.*– 2013.– Т.47, №11.– С.36-39.
12. Коруткин Д.Ю., Абилов Ж.А., Муzychкина Р.А., Толстиков Г.А. Природные флавоноиды. – Новосибирск: Академическое изд-во «Тео», 2007. – 232 с.
13. Зуев В.В. Применение ИК спектроскопии на предприятиях ТЭК. – СПб: Университет ИТМО, 2020. – 61 с.

References

1. Pan Y., Kong L., Xia X., Zhang W., Xia Z., Jiang F. [Antidepressant-like effect of icariin and its possible mechanism in mice]. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2005, vol.82, no.4, pp.686-694.
2. Xu H.-B., Huang Z.-Q. [Icariin enhances endothelial nitricoxide synthase expression on human endothelial cells *in vitro*]. *Vasc. Pharm.*, 2007, vol.47, no.1, pp.18-24.
3. Huang X., Zhu D.Y., Lou Y.J. [A novel anticancer agent, icaritin, induced cell growth inhibition, G₁ arrest and mitochondrial transmembrane potential drop in human prostate carcinoma PC-3 cells]. *Eur. J. Pharmacol.*, 2007, vol.564, no.1-3, pp.26-36.
4. Shevlyakova O.A., Vasilyev K.Yu., Ikhalaïnen A.A., Antokhin A.M., Taranchenko V.F., Goncharov V.M., Aksekov A.V., Mitrofanov D.A., Rodin I.A., Shpigun O.A. *Opredeleniye ikariina v moche metodom vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii v sochetanii s tandemnoy masspektrometriyey* [Determination of icariin in urine by high-performance liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry]. *Analitika i kontrol* [Analytics and control], 2015, vol.19, no.4, pp.316-322.
5. Shen P., Guo B.L., Gong Y., Hong Deborah Y.Q., Hong Y., Yong E.L. [Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of Epimedium species]. *Phytochemistry*, 2007, vol.68, no.10, pp.1448-1458.
6. Ma H.P., He X., Yang Y., Li M., Hao D., Jia Z. [The genus Epimedium: an ethnopharmacological and phytochemical review]. *J. Ethnopharmacol.*, 2011, vol.134, no.3, pp.519-541.
7. Zhang G., Yao Q., Sun Ch., Li B. Pan S. [Use of icaritin for the production of medicines]. Patent RF no. 2022125738, 2023.
8. <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01972672>
9. Horishny V.Y., Matiychuk V.S. [Synthesis, physico-chemical properties, drug likeness, and antitumor activity of 2-[5-(4-bromobenzylidene)-4-oxo-2-sulfanylidene-1,3-thiazolidin-3-yl]-3-methylbutanoic acid esters and amides]. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2021, vol.57, no.1, pp.25-31.
10. Pozdnyakov D.I., Adzhiakhmetova S.L., Chervonnaya N.M., Oganesyán E.T. *Khimicheskaya modifikatsiya ex planta flavonoida flordizina reaktsiyey oksimirovaniya i otsenka yego neyroprotektornoy aktivnosti* [Chemical modification ex planta of the flavonoid flordizin by oximation reaction and assessment of its neuroprotective activity]. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir Chemical Journal], 2023, vol.30, no.4, pp.17-21.
11. Evseeva O.S., Andreeva O.A., Oganesyán E.T. *Issledovaniye protsessa gidroliza hesperidina* [Study of the process of hesperidin hydrolysis]. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* [Chemical-Pharmaceutical Journal], 2013, vol.47, no.11, pp.36-39.
12. Korulkin D.Yu., Abilov Z.A., Muzychkina R.A., Tolstikov G.A. *Prirodnyye flavonoidy* [Natural flavonoids]. Novosibirsk, Academic publishing house «Theo», 2007 232 p.
13. Zuev V.V. *Primeneniye IK spektroskopii na predpriyatiyakh TEK* [Application of IR spectroscopy at fuel and energy enterprises]. Saint Petersburg, ITMO University Publ., 2020, 61 p.