

10. Khabriev R.U. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. JSC «Publishing House «Medicine». 2005:832. (in Russ)
11. Meshcheryakova S.A., Kataev V.A. Synthesis of new thietanypyrimidine and thietanylimidazole derivatives. Russian Journal of Organic Chemistry. 2013(49):1358-1360. (in Russ)
12. Shumadalova A.V. Synthesis of new biologically active thietane containing derivatives of thiopyrimidine. Medical Bulletin of Bashkortostan. 2017(12):59-62. (in Russ)
13. Buzhykin B.I., Nabiullin V.N., Mironov V.F. [et.al.] Synthesis and structure of dimephosphone pyridinoylhydrazones with antimycobacterial activity/ Pharmaceutical Chemistry Journal. 2013(47):35-39. (in Russ)

УДК 615.322

© Коллектив авторов, 2024

Г.Н. Турманидзе, Д.В. Коченко, В.В. Сорокин, К.С. Степанов, И.Е. Каухова

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ АНГИОПРОТЕКТОРА ДИОСМИНА

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Цель. Разработка технологии селективного извлечения гесперидина из растительного сырья с высокой чистотой и выходом с дальнейшим его превращением в диосмин.

Материал и методы. Образцы сырья (высушенной кожуры плодов *Citrus sinensis*) экстрагировали с предварительной обработкой раствором хлорида кальция и без него. Очистку проводили методом перекристаллизации из диметилсульфоксида (ДМСО). Превращение гесперидина в диосмин осуществляли его дегидрированием в основной среде с использованием кристаллического йода.

Результаты исследования. Использование солей кальция позволяет сократить время, необходимое для экстракции, и получить более чистый гесперидин-сырец на данной стадии по сравнению с экстракцией сырья без обработки. Содержание примесей при этом в таком продукте может быть уменьшено в 2 раза. Процесс выделения неочищенного гесперидина из маточного раствора может быть ускорен при его нагревании до 60°C. Осаждение гесперидина при его очистке рационально проводить в среде ДМСО : вода с объёмным соотношением компонентов 1:1. Определены условия проведения реакции превращения гесперидина в диосмин.

Заключение. Предложенная технология получения диосмина отличается от ранее предложенных вариантов простотой процесса, высокой чистотой получаемого извлечения и эффективностью. Она может быть использована для промышленного производства субстанции.

Ключевые слова: диосмин, гесперидин, ДМСО, соли кальция, экстракция, очистка.

G.N. Turmanidze, D.V. Kochenko, V.V. Sorokin, K.S. Stepanov, I.E. Kaukhova

ANGIOPROTECTOR DIOSMIN PRODUCTION TECHNOLOGY

The objective of this study is to develop a technology for the selective extraction of hesperidin from plant material with high purity and yield, followed by its modification into diosmin.

Material and methods. Samples of raw material (dried peels of *Citrus sinensis* fruits) were extracted with and without pretreatment with a CaCl₂ solution. Purification was conducted via recrystallization from dimethyl sulfoxide (DMSO). The transformation of hesperidin into diosmin was achieved by its dehydrogenation into a basic medium using crystalline iodine.

Results. The use of calcium salts reduces the time required for extraction and produces purer hesperidin raw material at this stage as compared to raw material extraction with no processing. The content of impurities in such a product can be reduced by 2 times. The process of isolating of crude hesperidin from the mother liquor can be accelerated by heating it to 60°C. It is more efficient to precipitate hesperidin in DMSO: water : volume ratio of components 1:1. The conditions for the reaction of converting hesperidin into diosmin were determined.

Conclusion. The proposed technology for obtaining diosmin differs from previously suggested methods in its simplicity, high purity of the obtained extraction, and efficiency. It can be utilized for industrial production of the substance.

Key words: diosmin, hesperidin, DMSO, calcium salts, extraction, purification.

Гесперидин и получаемый из него диосмин уменьшают растяжимость вен и повышают их тонус, снижают ломкость и проницаемость капилляров, улучшают микроциркуляцию крови. Диосмин и гесперидин как активные вещества входят в состав ряда наиболее востребованных на рынке лекарственных препаратов, таких как Флебодиа, Детралекс, Ангиорус и др. Ведутся исследования по оценке эффективности гесперидина в терапии рака, сахарного диабета, COVID-19 и других заболеваний [1,2].

Гесперидин – флавоноид, содержащийся в альbedo и флаведо кожуры плодов цитру-

совых, – является сырьём для производства диосмина [3].

Кожура цитрусовых – один из распространённых видов отходов пищевой промышленности. Сейчас в России нет технологий переработки, позволяющих использовать эти отходы в качестве сырья для получения гесперидина. Локализация производства на территории РФ, уменьшение времени производства и увеличение выхода по чистоте и массе являются актуальными задачами при разработке новой технологии.

Гесперидин проявляет слабокислые свойства. При значениях pH выше 11 он практиче-

ски полностью переходит в форму соли, растворимой в воде, что широко используется в методе щелочной экстракции. Однако эффективность этого метода недостаточно высока: при долговременном воздействии щелочи исходное сырье образует трудно фильтруемую желеобразную массу, загрязнённую балластными веществами; при кратковременном воздействии щелочи выход целевого вещества невысокий [4]. Гесперидин обладает свойствами комплексообразователя и может образовывать устойчивую коллоидную систему с пектином, являющимся одним из основных компонентов кожуры плодов [5]. Образование устойчивого комплекса гесперидин-пектин затрудняет извлечение гесперицина из сырья и замедляет процесс осаждения. Двухвалентный кальций может выступать в качестве нарушающего стабильность коллоидной системы агента: пектин образует более устойчивый комплекс с кальцием, тем самым «высвобождая» гесперидин [3].

В связи с этим актуальной целью представляется селективное извлечение гесперицина из растительного сырья с высокой чистотой и выходом с дальнейшей его модификацией в диосмин.

Материал и методы

Объектом исследования выступила высушенная кожура (альbedo и флаведо) плодов апельсина (*Citrus sinensis*) со степенью измельчения 1-3 мм. Предварительная обработка сырья осуществлялась раствором хлорида кальция, соотношение массы хлорида кальция к массе сырья 6:5, массы воды к массе сырья 1:1, время обработки – 24 часа.

Щелочная экстракция проводилась методом мацерации. Раствор для предварительной обработки доводили до pH 11,2 добавлением сухого гидроксида натрия; соотношение сырье: экстрагент составляло 1:1, время экстракции – 1 час. Осаждение гесперицина осуществлялось добавлением 70% раствора уксусной кислоты до pH 3,5. Для очистки осадка гесперицина использовался метод перекристаллизации из смеси диметилсульфоксида (ДМСО) и воды, промывка осадка осуществлялась спиртом этиловым 96%. Контроль выхода гесперицина проводили спектрофотометрическим методом. Расчёт растворимости гесперицина выполняли с помощью термодинамической модели NRTL-SAC [4].

Реакцию превращения гесперицина в диосмин проводили следующим образом: гесперидин растворяли в пиридине в соотношении 1:7 по массе. Далее прибавляли гидроксид натрия в соотношении 1:10 по массе и йод кристаллический в соотношении 1:0,5 по мас-

се. Раствор доводили до кипения в колбе с обратным холодильником, время реакции – 9 часов. Контроль полноты превращения гесперицина в диосмин осуществляли с помощью метода УФ- спектрофотометрии.

Очистку диосмина осуществляли в несколько этапов. На первом этапе отгоняли пиридин нагреванием раствора с прямым холодильником. На втором этапе удаляли йод добавлением к полученной смеси метилового спирта и нагреванием полученного раствора до кипения с дальнейшей фильтрацией и сушкой под вакуумом получаемого осадка. На третьем этапе осадок растворяли в 5% водном растворе щелочи с добавлением тиосульфата натрия и осаждали добавлением соляной кислоты до значения pH = 3-4 до образования осадка. Полученный осадок отфильтровывали и осуществляли 3-кратную перекристаллизацию диосмина из ДМСО. Качественный анализ диосмина осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Хроматограммы получали с использованием жидкостного хроматографа Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) с колонкой Supelcosil C18 (250 x 4,6, 5 мкм), оснащённой диодно-матричным детектором SPD-M20A. Условия хроматографии: подвижная фаза А – 0,1% об. ТФУ в сверхчистой H₂O; подвижная фаза В – 0,1% об. TFA в ацетонитриле класса «для ВЭЖХ», скорость подвижной фазы составляла 1 мл/мин.

Обработку экспериментальных данных производили с помощью прикладной статистической программы Minitab v. 21.

Результаты и обсуждение

Для оценки эффективности предварительной обработки сырья раствором хлорида кальция сырье делили на 2 части. Первая часть сырья перед экстракцией проходила предварительную обработку раствором соли, вторую часть не обрабатывали. Экстрагирование сырья проводили согласно описанной методике. Растворы после экстракции отделяли от шрота и фильтровали. Полученный фильтрат делили на равные части, доводили до pH=3,5, направляли на отстаивание при температурах 3°C (при охлаждении), 20°C (нормальные условия), 60°C (при нагревании).

В извлечениях из предварительно обработанного солью кальция сырья с уменьшением значения pH наблюдалось осветление раствора до светло-жёлтого цвета, далее с течением времени происходило образование светлого хлопьевидного осадка по всему объёму. Выпадение осадка происходило наиболее быстро (в течение 15-20 минут после начала отстаивания) из нагреваемых извлечений.

Извлечения, полученные из необработанного сырья, изменяли окраску незначительно. С течением времени в них наблюдалось помутнение с образованием коллоидных растворов без видимого выпадения осадка.

С целью полноты прохождения процесса отстаивания все растворы выдерживали в течение 24 часов. За это время достигалось полное осаждение гесперидина, что упрощало процесс фильтрации и обеспечивало полное выделение целевого вещества. Выпавший осадок фильтровали под вакуумом и сушили при 40°C в сушилке конвективного типа. Из извлечений, полученных на основе предварительно обработанного сырья, отстаивавшихся при нагревании, получили максимальное количество осадка – $1,28 \pm 0,04$ г. (1,28% от массы сырья). Осадок представлял собой мелкодисперсный порошок серовато-белого цвета с содержанием гесперидина до $88 \pm 2\%$ по массе. Осадок из извлечений, полученных из сырья, не прошедшего предобработку, имел жёлто-коричневый цвет. Масса осадка – $0,20 \pm 0,02$ г, содержание гесперидина – до $78 \pm 2\%$ по массе. Результаты серии экспериментов ($n=5$) представлены в таблице.

Таблица

Масса выделенного осадка (неочищенного гесперидина) по результатам экспериментов		
№ опыта	Количество осадка, г (предварит. обработанное сырье)	Количество осадка, г (необработанное сырье)
1	1,29	0,21
2	1,29	0,23
3	1,18	0,21
4	1,17	0,19
5	1,27	0,18
Среднее значение	1,28	0,20
Среднеквадратичное отклонение	0,04	0,02

Таким образом, при предварительной обработке сырья раствором соли кальция выход осадка увеличивается, а время щелочной экстракции, необходимое для его выделения, сокращается. Это также позволяет избежать извлечения большого количества балластных веществ, усложняющих проведение технологического процесса на этапе фильтрации. Количество примесей, которые необходимо отделить на этапе очистки при этом значительно снижается, что в итоге приводит к получению более чистого продукта.

В качестве метода дальнейшей очистки был выбран метод перекристаллизации из

ДМСО. Гесперидин имеет хорошую растворимость в чистом ДМСО, при добавлении воды его растворимость значительно снижается, что приводит к выпадению его в виде микрокристаллического осадка.

Чтобы оценить количество воды, которое нужно добавлять в ДМСО, использовали термодинамическую модель NRTL-SAC [4]. Исходя из результатов моделирования, растворимость гесперидина резко снижается при увеличении объёмной доли воды в ДМСО до 30-40%. Дальнейшее добавление воды в значительно меньшей степени повлияет на растворимость гесперидина, а излишнее разбавление раствора приведёт к снижению пересыщения.

Неочищенный гесперидин растворяли в нагретом ДМСО. С целью осаждения гесперида к полученному раствору ДМСО добавляли воду в различных соотношениях. В пробах с концентрацией ДМСО выше 50% появления осадка не наблюдалось, а при концентрации ДМСО в пределах от 30 до 50% выход гесперида достигал 1,24% от массы сырья. Уменьшение концентрации ДМСО в растворах приводило к уменьшению выхода. Результаты экспериментов согласуются с данными, полученными термодинамическим моделированием. После фильтрации осадки промывали спиртом этиловым для удаления остатка ДМСО с растворенными в нем примесями. Сопоставление ультрафиолетовых спектров в диапазоне 260-300 нм полученного осадка и стандартного образца гесперида показало, что в обоих случаях наблюдается пик при 290 нм, характерный для гесперида.

Далее проводили реакцию превращения гесперида в диосмин и его последующую очистку согласно описанной методике. Проведённый анализ методом ВЭЖХ показал, что время удерживания полученного образца и стандарта диосмина совпадает. Чистота полученного диосмина составила $90\% \pm 2\%$.

Заключение

Показана эффективность использования солей двухвалентного кальция для сокращения времени щелочной экстракции и увеличения выхода целевого продукта. Метод перекристаллизации из водных растворов ДМСО (30-50% об.) эффективен для получения гесперида. Определены условия проведения реакции превращения гесперида в диосмин с чистотой $90\% \pm 2\%$.

Сведения об авторах статьи:

Турманидзе Георгий Нодарович – аспирант, ассистент кафедры процессов и аппаратов химической технологии ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России. Адрес: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14.

Коченко Дарья Вадимовна – учебный мастер кафедры процессов и аппаратов химической технологии ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России. Адрес: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14.

Сорокин Владислав Валерьевич – к.фарм.н., доцент, зав. кафедрой процессов и аппаратов химической технологии ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России. Адрес: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14. E-mail: vladislav.sorokin@pharminnotech.com

Степанов Константин Сергеевич – аспирант, ассистент кафедры процессов и аппаратов химической технологии ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России. Адрес: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14.

Каухова Ирина Евгеньевна – д.фарм.н., профессор кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России. Адрес: 197376, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rahmani, A.H. Hesperidin, a Bioflavonoid in Cancer Therapy: A Review for a Mechanism of Action through the Modulation of Cell Signaling Pathways / A.H. Rahmani, A.Y. Babiker, S. Anwar // *Molecules*. – 2023. – 28(13). – P. 5152.
2. Hesperidin: A Potential Therapeutic Agent against COVID-19 / A.K. Dhingra [et al.] // *Current drug discovery technologies*. – 2023. – 20(2). – e171022210062.
3. New Sustainable Process for Hesperidin Isolation and Anti-Ageing Effects of Hesperidin Nanocrystals / D. Stanicic [et al.] // *Molecules*. – 2020. – 25(19). – P. 4534.
4. Степанов, К.С. Применение термодинамических моделей для прогнозирования растворимости биологически активных веществ / К.С. Степанов, Г.Н. Турманидзе, В.В. Сорокин, А.Д. Сахаров // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2023. – №12(4). – С. 46-53.
5. Ben-Shalom, N. Natural colloidal particles: the mechanism of the specific interaction between hesperidin and pectin / N. Ben-Shalom, R. Pinto // *Carbohydrate Polymers*. – 1999. – 38(2). – P.179-182.

REFERENCES

1. Rahmani A.H., Babiker A.Y., Anwar S. Hesperidin, a Bioflavonoid in Cancer Therapy: A Review for a Mechanism of Action through the Modulation of Cell Signaling Pathways. *Molecules*. 2023; 28(13):5152. (in Engl)
2. Dhingra A.K. [et al.] Hesperidin: A Potential Therapeutic Agent against COVID-19. *Current drug discovery technologies*. 2023;20(2):e171022210062. (in Engl)
3. Stanicic D. [et al.] New Sustainable Process for Hesperidin Isolation and Anti-Ageing Effects of Hesperidin Nanocrystals. *Molecules*. 2020;25(19):4534. (in Engl)
4. Stepanov K.S., Turmanidze G.N., Sorokin V.V., Sakharov A.D. Application of Thermodynamic Models to Predict the Solubility of Biologically Active Substances. *Drug development & registration*. 2023;12(4):46-53. (in Russ)
5. Ben-Shalom N., Pinto R. Natural colloidal particles: the mechanism of the specific interaction between hesperidin and pectin. *Carbohydrate Polymers*. 1999; 38(2):179-182. (in Engl)