

УДК 541.1:615.214

DOI: 10.31040/2222-8349-2020-0-1-89-93

**ГИДРОЛИЗ СЛОЖНОЭФИРНОЙ СВЯЗИ В МОЛЕКУЛЕ РЕБАУДИОЗИДА А
В ПРИСУТСТВИИ ЙОДА В ВОДНО-СПИРТОВЫХ РАСТВОРАХ****© А.Г. Естехина, Л.Р. Ахтарьянова, И.Г. Конкина, А.Н. Лобов,
С.П. Иванов, В.Н. Козлов, Ю.И. Муринов**

При исследовании взаимодействия дитерпенового гликозида ребаудиозида А (ReA) с йодом в водно-спиртовой среде методом ВЭЖХ обнаружено образование побочного продукта реакции. Данное соединение было выделено методом полупрепаративной ВЭЖХ и идентифицировано на основе данных 1D (^1H , ^{13}C) и 2D (COSY, HSQC, HMBC) ЯМР спектроскопии, которые свидетельствуют о гидролитическом отщеплении от агликона гликозидного остатка, связанного с ним сложноэфирной связью. При этом тригликозидный фрагмент не гидролизуется. Таким образом, данный продукт реакции представляет собой дитерпеновый гликозид ребаудиозид В. Гидролитическому расщеплению в данном случае может способствовать самоионизация молекулярного йода, протекающая в полярных растворителях с образованием HI и соответствующем снижении рН реакционной смеси.

Ключевые слова: ребаудиозид А, сложноэфирная связь, гидролиз, йод, водно-спиртовые растворы.

Введение. Дитерпеноидные гликозиды, а именно стевиозид и ребаудиозид А (ReA) (рис. 1), являются главными составляющими листьев *Stevia rebaudiana*. Они представляют собой гликозиды дитерпен-стевиола (энт-13-гидроксикаур-16-ен-19-оевой кислоты), включающего в состав дитерпеноидного каркаса циклопентановый фрагмент энт-каурановой геометрии [1].

Эти гликозиды в 100–300 раз слаще, чем сахароза и были одобрены для использования в качестве подсластителей в ряде стран, включая США, Японию, Китай и Бразилию, чтобы удовлетворить возрастающий спрос потребителей на низкокалорийные продукты [2]. Биологические и фармацевтические свойства каурановых

соединений были известны достаточно давно; они влияют на клеточный метаболизм, углеводный метаболизм, абсорбцию глюкозы кишечником, энергетический обмен в митохондриях гепатоцитов, а также на углеводный и кислородный метаболизм в клетках почек [3]. Дитерпеноиды *Stevia rebaudiana* являются перспективными соединениями в области медицинской химии, проявляют разнообразные схемы трансформации, включающие скелетные перестройки, и обладают противоопухолевой, антигипергликемической, противовоспалительной и антибактериальной активностью [4]. Поскольку создание новых препаратов с антимикробной активностью является в настоящее время актуальной задачей [5], нами изучалась

ЕСТЕХИНА Анна Геннадьевна, Башкирский государственный университет,

e-mail: anyutochka.estehina@mail.ru

АХТАРЬЯНОВА Ляйсан Рашитовна, Уфимский государственный нефтяной технический университет, e-mail: ahtalyai@icloud.com

КОНКИНА Ирина Григорьевна – к.х.н., Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,

e-mail: irkonk@anrb.ru

ЛОБОВ Александр Николаевич – к.х.н., Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,

e-mail: lobovan@anrb.ru

ИВАНОВ Сергей Петрович – к.х.н., Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,

e-mail: ivanov_sp@anrb.ru

КОЗЛОВ Валерий Николаевич – д.б.н., Башкирский институт технологий и управления (филиал) ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления имени К.Г. Разумовского» (Первый казачий университет), e-mail: bioritom@mail.ru

МУРИНОВ Юрий Ильич – д.х.н., Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,

e-mail: murinov@anrb.ru

возможность получения соединений ReA с йодом, причем в процессе синтеза было зарегистрировано образование некоторого количества побочного продукта, идентификация которого явилась целью настоящей работы.

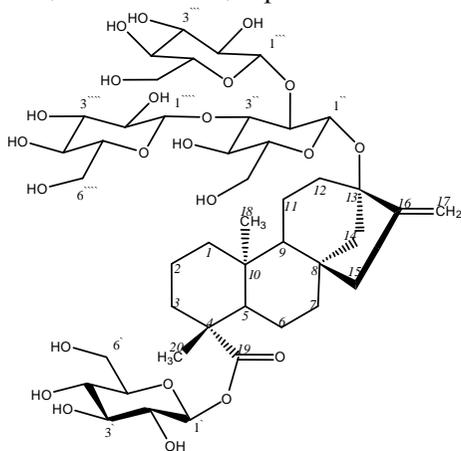


Рис. 1. Ребаудиозид А

Экспериментальная часть. В работе были использованы ReA производства «QUFU HEIGEN STEVIA PRODUCTS CO., LTD», КНР и кристаллический йод, очищенный возгонкой. Взаимодействие ReA с йодом проводили

в мольном соотношении 1:1 в водно-спиртовых растворах при 50°C. За ходом реакции следили методом ВЭЖХ.

Хроматографический анализ проводился на хроматографе Shimadzu LC-20 (Shimadzu, Япония) со спектрофотометрическим диодно-матричным детектором с колонкой с фазой Luna C18 250×4,6 мм; 5 мкм (Phenomenex, США). В качестве подвижной фазы использовался элюент состава ацетонитрил:вода = 60:40. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Детектирование проводилось при длине волны 225 нм. 20 мкл анализируемого образца, отобранного микрошприцем (Hamilton, США), объемом 25 мкл вводилось в аналитическую петлю хроматографа объемом 10 мкл и записывалась хроматограмма. Полупрепаративное разделение методом ВЭЖХ реакционной смеси проводилось на хроматографе со спектрофотометрическим детектором Аквилон «Стайер». Применялась колонка с фазой Luna C18 250×10 мм; 10 мкм (Phenomenex, США). В качестве подвижной фазы использовался элюент состава ацетонитрил:вода = 60:40. Скорость потока составляла 4 мл/мин. Детектирование проводилось при длине волны 245 нм.

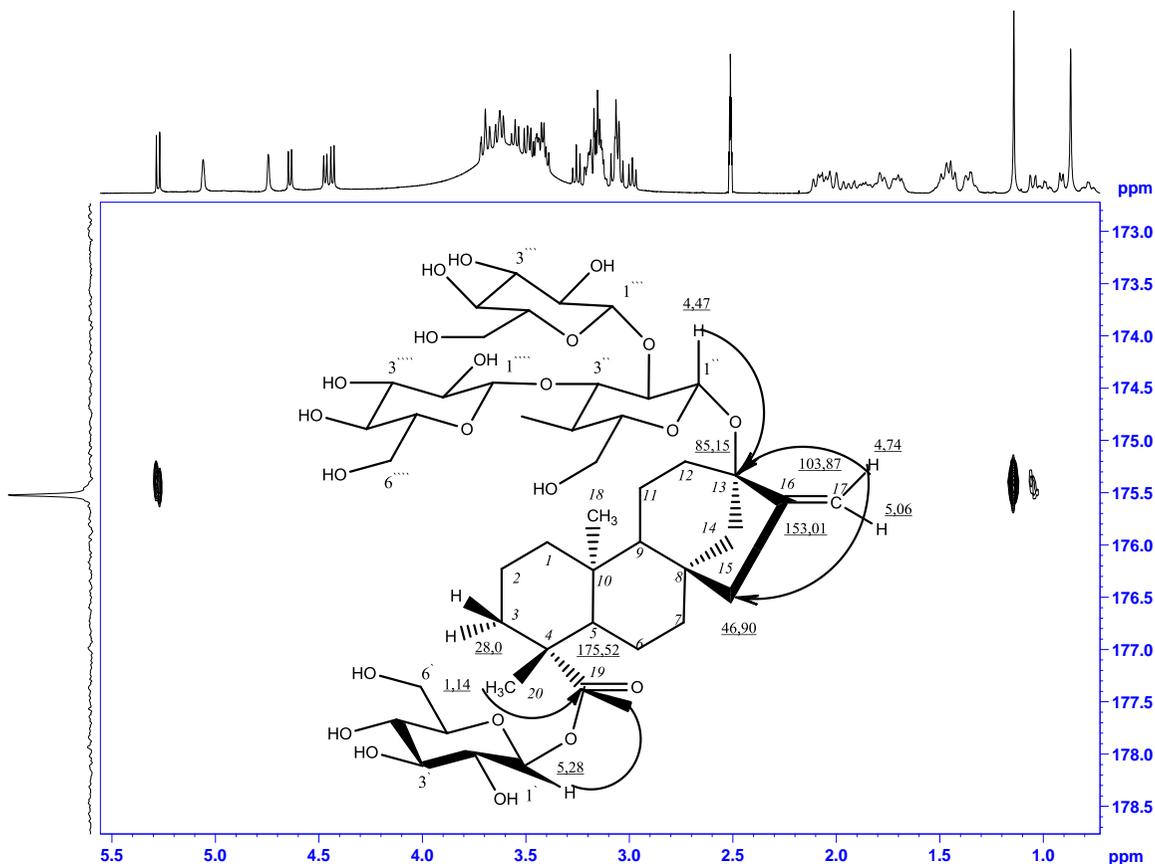


Рис. 2. Фрагмент $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ HMBC спектра ReA

Структурная характеристика ReA и выделенного продукта была выполнена на основе 1D (^1H , ^{13}C) и 2D (COSY, HSQC, HMBC) ЯМР спектральных данных. Спектры ЯМР ^{13}C регистрировались на импульсном спектрометре «Bruker» Avance III с рабочей частотой 500.13 МГц (^1H) и 125.47 (^{13}C) с использованием 5 мм датчика с Z-градиентом PABBO при постоянной температуре образца 298К в $\text{DMSO-}d_6$. Химические сдвиги в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C приведены в м.д. относительно сигнала внутреннего стандарта – тетраметилсилана (ТМС). Двумерные спектры зарегистрированы в стандартных режимах многоимпульсных последовательностей программного обеспечения прибора (подробное описание приведено в [6]). Для записи ЯМР спектров готовили растворы ReA и продукта в $\text{DMSO-}d_6$.

Обсуждение результатов. Структура исходного ReA была подтверждена данными ЯМР спектроскопии с использованием корреляционных спектров и согласуется с литературными данными [1]. В спектре ЯМР ^1H присутствуют сигналы 4-х аномерных протонов от 4-х гликозильных фрагментов; на наличие сложноэфирной связи между атомами C(19) и C'(1) указывает корреляция протонов метильной группы C(20) и протона атома углерода C'(1) с атомом углерода C(19). Корреляция протонов атомов углерода C(17) и C''(1) с атомом углерода C(13), подтверждает наличие гликозидной связи между дитерпеновой и триглюкозидной частью молекулы (рис. 2).

Методом ВЭЖХ установлено время выхода ReA в указанных условиях, которое состави-

ло 2.1 мин. В ходе реакции наблюдалось образование нецелевого продукта со временем выхода 2.8 мин. Данное соединение было выделено методом полупрепаративной ВЭЖХ в виде фракции 2 и идентифицировано методом ЯМР спектроскопии как продукт гидролиза ReA по сложноэфирной связи, т.е., образовался гликозид, который принято называть ребаудиозид В (ReB) [6].

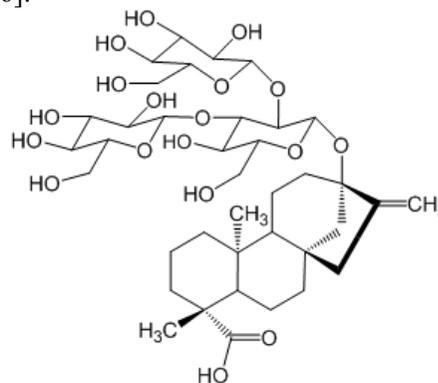


Рис. 3. Ребаудиозид В

В спектре продукта появляется сигнал ядра атома углерода карбоксильной группы при 178 м.д. Наличие свободной карбоксильной группы подтверждается гетероядерной корреляцией протонов метильной группы C(20) с атомом углерода C(19) карбоксильной группы. При этом тригликозидный фрагмент не гидролизуются, о чем свидетельствует присутствие в спектре ЯМР ^1H сигналов 3-х аномерных протонов от 3-х гликозильных фрагментов, а также корреляция между атомом C(1)' гликозильного цикла и атомом углерода C(13) дитерпенового фрагмента продукта (рис. 4).

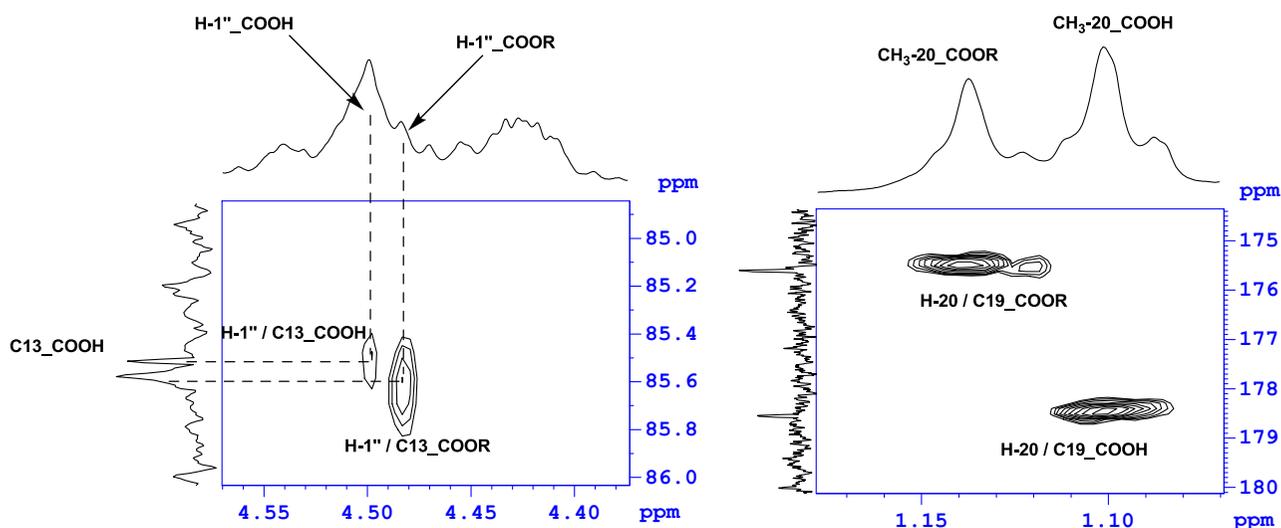


Рис. 4. Фрагменты $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ HMBC спектра соединения из фракции 2

Подобный гидролиз гликозидовой эфирной связи при C(18) с образованием ReV указывается как один из путей деструкции ReA в кислой среде [2]. Образование ReV как одного из продуктов гидролиза ReA в мягких кислотных условиях отмечено авторами [7]. Как известно [8], в растворах йода в полярных растворителях происходит самоионизация молекулярного йода с образованием HI, что приводит к снижению pH реакционной смеси и может способствовать гидролитическому расщеплению гликозида. Проведенное нами наблюдение за изменением кислотности реакционной смеси при взаимодействии ReA с йодом в водно-этанольной среде действительно показало снижение pH в процессе реакции. Сравнительный эксперимент по возможному гидролитическому расщеплению ReA в тех же условиях в отсутствие йода дал отрицательный результат.

Заключение. Таким образом, при взаимодействии ребаудиозида А с йодом в водно-спиртовой среде наблюдается гидролиз сложной эфирной связи ReA с образованием ребаудиозида В.

Работа выполнена в рамках государственных заданий Министерства науки и высшего образования (№ АААА-А17-117011910027-0 и № АААА-А17-117011910033-1) с использованием оборудования ЦКП «Химия» УфИХ УФИЦ РАН.

Литература

1. Chaturvedula V.S.P., Prakash I. Acid and alkaline hydrolysis studies of stevioside and rebaudioside A // J. of Applied Pharmaceutical Science. 2011. V. 01 (08). P. 104–108.
2. Prakash I., Dubois G.E., Clos J.F., Wilkens K.L., Fosdick L.E. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener // Food and Chemical Toxicology. 2008. V. 46. P. S75–S82.
3. The use of kauranes compounds in the manufacture of medicament for treatment of cardiac hypertrophy and pulmonary hypertension // US Patent App. 15/932,505. № 20180214400.
4. Wang M., Li H., Xu F., Gao X., Li J., Xu S., Zhang D., Wu X., Xu J.H., Li D. Diterpenoid lead stevioside and its hydrolysis products steviol and isosteviol: Biological activity and structural modification // European J. of Medicinal Chemistry. 2018. V. 156, № 5. P. 885–906.
5. Maqbool M., Ishaq G.M. Recent promising advances in development of antimicrobial agents: A review // J. of Drug Delivery and Therapeutics. 2018. V. 8, № 5. P. 82–86.

6. Конкина И.Г., Иванов С.П., Лобов А.Н., Муллагильдина К.И., Одиноква Е.В., Тучкина Л.К., Файзрахманов И.С., Козлов В.Н. Соотношение звеньев глюкозы и фруктозы в макромолекулах образца инулина: определение методом ^{13}C ЯМР спектроскопии // Вестник Башкирского университета. 2018. Т. 23, № 3. С. 705–709. DOI:10.33184/bulletin-bsu-2018.3.24.

7. Perera W.H., Docampo M.L., Wiggers F.T., Hufford C.D., Fronczek F.R., Avula B., Khan I.A., McChesney J.D. Endocyclic double bond isomers and by-products from rebaudioside A and stevioside formed under acid conditions // Phytochemistry Letters. 2018. V. 25. P. 163–170.

8. Hayakawa K., Nakamura S. The determination of the formation constants of the triiodide ion in water-alcohol mixed solvents at various temperatures // Bull. Chem. Soc. Japan. 1977. V. 50, № 3. P. 565–569.

References

1. Chaturvedula V.S.P., Prakash I. Acid and alkaline hydrolysis studies of stevioside and rebaudioside A. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2011, vol. 01 (08), pp. 104–108.
2. Prakash I., Dubois G.E., Clos J.F., Wilkens K.L., Fosdick L.E. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. Food and Chemical Toxicology, 2008, vol. 46, pp. S75–S82.
3. The use of kauranes compounds in the manufacture of medicament for treatment of cardiac hypertrophy and pulmonary hypertension. US Patent App. 15/932,505. No. 20180214400.
4. Wang M., Li H., Xu F., Gao X., Li J., Xu S., Zhang D., Wu X., Xu J.H., Li D. Diterpenoid lead stevioside and its hydrolysis products steviol and isosteviol: Biological activity and structural modification. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018, vol. 156, no. 5. P. 885–906.
5. Maqbool M., Ishaq G.M. Recent promising advances in development of antimicrobial agents: A review. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 2018, vol. 8, no. 5, pp. 82–86.
6. Konkina I.G., Ivanov S.P., Lobov A.N., Mullagildina K.I., Odinikova E.V., Tuchkina L.K., Fayzrakhmanov I.S., Kozlov V.N. Ratio of glucose to fructose in inulin-type macromolecules: Determination using ^{13}C NMR spectroscopy. Vestnik Bashkirskogo universiteta, 2018, vol. 23, no. 3, pp. 705–709. DOI:10.33184/bulletin-bsu-2018.3.24.
7. Perera W.H., Docampo M.L., Wiggers F.T., Hufford C.D., Fronczek F.R., Avula B., Khan I.A., McChesney J.D. Endocyclic double bond isomers and by-products from rebaudioside A and stevioside formed under acid conditions. Phytochemistry Letters, 2018, vol 25, pp. 163–170.
8. Hayakawa K., Nakamura S. The determination of the formation constants of the triiodide ion in water-alcohol mixed solvents at various temperatures. Bull. Chem. Soc. Japan, 1977, vol. 50, no. 3, pp. 565–569.



AUTOMATION OF DATA OBTAINING ON MI-1201 MASS SPECTROMETER

© **A.S. Erastov, I.S. Nazarov, M.F. Abdullin**

THE ESTER BOND HYDROLYSIS IN A MOLECULE OF REBAUDIOSIDE A AT THE PRESENCE OF IODINE IN WATER-ALCOHOL SOLUTIONS

© **A.G. Estechina¹, L.R. Achtarjanova², I.G. Konkina³,
A.N. Lobov³, S.P. Ivanov³, V.N. Kozlov⁴, Yu.I. Murinov³**

¹Bashkir State University,
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

²Ufa State Petroleum Technical University
1, ulitsa Kosmonavtov, 450062, Россия, Ufa, Russian Federation

³Ufa Institute of Chemistry – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

⁴Bashkir Institute of Technology and Management (branch) FGBOU VO "Moscow State University
of Technology and Management named after KG Razumovsky (First Cossack University)
34, ulitsa Smolenskaya, 453850, Meleuz, Russian Federation

The HPLC study of the interaction of diterpene glycoside rebaudioside A (ReA) with iodine in an aqueous-alcoholic medium showed the formation of a reaction by-product. This compound was isolated by semi-preparative HPLC and identified on the basis of 1D (1H, 13C) and 2D data (COZY, HSQC, HMBC) NMR spectroscopy. The data obtained indicate hydrolytic cleavage of the glycosidic residue, which is linked with aglycone by an ester bond. At the same time, the triglycoside fragment is not hydrolyzed. Thus, this reaction product is a diterpenic glycoside rebaudioside B. Self-ionization of molecular iodine, which occurs in polar solvents with the formation of HI and a corresponding decrease in the pH of the reaction mixture, may contribute in this case to the hydrolytic cleavage of ReA.

Key words: rebaudioside A, ester bond, hydrolysis, iodine, water-alcohol solutions.