

*На правах рукописи*

ЛЕБЕДЕВА РЕГИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИНТЕЗА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ  
ПРОИЗВОДНЫХ БЕТУЛИНА КАК КОМПОНЕНТОВ  
ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2016

Диссертационная работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор химических наук, профессор **Мельникова Нина Борисовна**

**Официальные оппоненты:**

**Коркодинова Любовь Михайловна** – доктор фармацевтических наук, профессор, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии факультета очного обучения, заведующий кафедрой

**Ивановская Елена Алексеевна** - доктор фармацевтических наук, профессор, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:** государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курск.

Защита состоится «2» июня 2016 г. в \_\_.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/science/referats>) государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_\_» марта 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат фармацевтических наук,  
доцент

Петрухина Ирина Константиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования.**

Тритерпеноиды лупанового ряда по своим свойствам и строению сходны с липофильными стеролами, которые относительно легко проникают через плазматические мембраны, а затем свободно секретируются клетками стероидогенных эндокринных желез. [Falamas A., 2011] Анализ связи «биологическая активность – структура» показывает, что все производные бетулина (бетулиновая и бетулоновая кислоты, сукцинаты и ацетаты и др. эфиры органических кислот) проявляют в различной степени противоопухолевые, гиполипидемические, гепатопротекторные и противовирусные свойства. [Кислицын А.Н., 1994; Толстиков Г.А., 2005; Cichewicz R.H., 2004; Ciurlea S., 2010]

Сопоставление влияния бетулина и бетулиновой кислоты на противоопухолевую активность показало, что бетулиновая кислота существенно уступает бетулину за счет совместного действия комплексов или ассоциатов бетулина с холестеролом. [Mullauer F.B., 2009] Взаимодействие бетулина с холестеролом, вероятно, близко к доказанной ассоциации  $\beta$ -ситостерола с холестеролом [Ostlund R., 2002], которая в конечном счете приводит к гиполипидемическому эффекту, поскольку для достижения последнего немаловажным является большая липофильность тритерпеноида.

Однако, несмотря на многочисленные публикации по фармакологическим свойствам производных бетулина на фармацевтическом рынке отсутствуют гиполипидемические лекарственные средства на основе эфиров бетулина.

Одной из причин отсутствия лекарственных средств (ЛС) с производными бетулина является сложность препаративного синтеза этих соединений как потенциальных лекарственных веществ, требующих достижения высокой чистоты целевого продукта, отсутствие токсичных реагентов и прекурсоров в процессе его получения, технологичность и экономичность синтеза.

Кроме того, создание лекарственных форм осложняется плохой растворимостью бетулина как в воде, так и в липофильных средах. Векторами доставки бетулина могут выступать каротиноиды, токолы, фитостеролы и некоторые биологически активные вещества. Перспективной средой для препаратов являются богатые вышеупомянутыми веществами растительные масла, в том числе масло семян тыквы.

**Степень разработанности темы.** Синтез различных эфиров бетулина широко представлен в работах отечественных ученых Толстикова Г.А., Флехтер О.Б., Левданского В.А. (1990-2013) и др., а также в зарубежной печати (Krasutsky P.A., Pohjala L., 1998-2009). В эксперименте представлен широкий спектр фармакологических свойств эфиров бетулина (противоопухолевые, противотуберкулезные, антибактериальные и др.). Однако серьезные экспериментальные доказательства гипополидемических и гепатопротекторных свойств приведены только в работах Василенко на примере диацетата бетулина. [Василенко Ю.К., 2005]

**Цель исследования.** Разработка гипополидемического препарата производных бетулина, совершенствование методов их получения, стандартизации и контроля качества препарата.

**Задачи исследования.**

1. Обоснование выбора производных бетулина как потенциальных гипополидемических субстанций.
2. Совершенствование методики синтеза бетулоновой кислоты, ацетатов и сукцинатов бетулина.
3. Разработка метода получения дифосфата бетулина.
4. Разработка методик идентификации и количественного определения производных бетулина.
5. Обоснование выбора масла семян тыквы – растительного сырья, проявляющего гипополидемические свойства, как среды в препарате производных бетулина.
6. Разработка состава гипополидемического препарата, содержащего в качестве действующих веществ производные бетулина в масле семян тыквы и исследование гипохолестеринемического и гипополидемического действий препарата с производными бетулина в эксперименте на животных.
7. Установление нормативов качества и разработка проектов фармакопейных статей новых субстанций и гипополидемического препарата.

**Научная новизна.**

- Впервые разработан гипополидемический препарат, содержащий бетулоновую кислоту, (или) диацетат бетулина, или их смесь, тимол в масле семян тыквы (Положительное решение о выдаче патента от 19.02.2016, заявка № 2014143673 от 30.10.2014).

- Разработана методика нового синтеза эфиров фосфорной кислоты бетулина с высоким выходом (для фосфатов бетулина отсутствуют номера CAS в базе данных «Common Chemistry»).
- Разработаны методики анализа (идентификация и количественное определение) компонентов предлагаемого гиполипидемического препарата в виде капсул.

#### **Научно-практическая значимость и внедрение результатов исследования.**

Обоснован состав гиполипидемического препарата, содержащего производные бетулина. Изучено гипохолестеринемическое и гиполипидемическое действие разработанного препарата в эксперименте на животных. Представлены результаты по разработке норм качества гиполипидемического препарата. Разработаны проекты фармакопейных статей на субстанции и гиполипидемический препарат производных бетулина. Разработанные методики анализа компонентов гиполипидемического препарата производных бетулина: бетулоновой кислоты, диацетата бетулина и тимола в масле семян тыквы используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, а также в учебный процесс государственного бюджетного образовательного учреждения среднего профессионального образования Нижегородской области «Нижегородский медицинский базовый колледж», в работе государственного автономного учреждения здравоохранения Нижегородской области «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств».

**Методология и методы исследования.** Методологической основой диссертационного исследования явились поиск, анализ и обобщение зарубежных и отечественных литературных данных в области синтеза и исследования фармакологической активности производных бетулина. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан план выполнения этапов диссертационной работы, выбраны объекты исследования и подобран комплекс современных методов исследования.

Объектами исследования стали бетулоновая кислота, диацетат, дисукцинат и дифосфат бетулина. К основным методам, использованным для доказательства подлинности и количественного определения субстанций, относились ИК-, УФ-,  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^{31}\text{P}$ -ЯМР- и масс-спектрометрия, ОФ-ВЭЖХ, ТСХ, фотоколориметрия.

Математическая обработка данных проводилась с использованием современных компьютерных технологий.

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки.**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России (номер государственной регистрации 01201063248) по научной проблеме «Разработка и исследование новых лекарственных средств на основе природных и синтетических веществ».

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Усовершенствованная методика синтеза бетулоновой кислоты окислением бетулина бихроматом калия и серной кислотой в присутствии гетерополикислот, усовершенствованная методика синтеза диацетата бетулина, позволяющая получить целевой продукт с выходом не менее 90% при 100%-ной конверсии бетулина.

2. Результаты по методикам качественного и количественного определения моно- и диацетата бетулина.

3. Методика синтеза моно- и дисукцинатов бетулина, позволяющая улучшить условия и режим синтеза, увеличить выход (не менее 85% при 100%-ной конверсии бетулина), улучшить условия очистки продукта.

4. Результаты по обоснованию состава гиполипидемического препарата, содержащего производные бетулина.

5. Оценка гипохолестеринемического и гиполипидемического действия разработанного препарата в эксперименте на животных.

6. Методика нового синтеза 3,28-дифосфата бетулина.

7. Результаты по разработке норм качества гиполипидемического препарата.

**Степень достоверности результатов проведенных исследований** базируется на достаточных по своему объему данных и количеству материала, современных методах исследования и статистической обработке данных.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Работа соответствует паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия по пунктам 1, 2, 3.

**Апробация результатов исследования.** Результаты диссертационной работы были представлены на XI научной сессии молодых учёных и студентов «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2012); I Всероссийской XII ежегодной научной сессии молодых учёных и

студентов с международным участием «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2013); II Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты современной науки» (Белгород, 2014); II Всероссийской с международным участием XIII научной сессии молодых учёных и студентов «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2015); III Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины в современных условиях» (г. Санкт-Петербург, 2016); VIII Международной научно-практической конференции «Приоритетные направления развития науки и образования» (г. Чебоксары, 2016); XXIV Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты» (г. Новосибирск, 2016).

**Публикации по теме диссертации.** Материалы диссертации опубликованы в 10 печатных изданиях, из них 5 в журналах, включенных ВАК Минобрнауки РФ в перечень рецензируемых научных изданий.

**Личный вклад автора.** Результаты, приведённые в диссертации, получены при непосредственном участии автора в проведении физико-химических и биологических исследований производных бетулина в гипополидемическом препарате. Автор является основным исполнителем написания публикаций по теме диссертации и разработке нормативной документации на предложенный состав капсул.

**Объём и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной методам и объектам исследования, двух глав собственных исследований, выводов, списка литературы, включающего 109 наименований отечественных и зарубежных авторов, списка сокращений и приложений. Работа изложена на 163 страницах машинописного текста, содержит 25 таблицы, 19 рисунков, 22 схемы.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Характеристика объектов и методов исследования**

**Объекты исследования:** Бетулин получали из бересты березы повислой (бородавчатой) – *Betula Pendula Roth* в соответствии с методикой Кислицына А.Н.

**Методы исследования и приборы:** ИК-спектрофотометр «IR Prestige-21» (Shimadzu, Japan); ВЭЖ-хроматограф «LC-20Avp» (Shimadzu, Japan); ЯМР-спектрометр «Agilent DD2 400» (Agilent Technologies, USA); ЯМР-спектрометр «Bruker AM500» (Bruker Daltonik GmbH, Germany); УФ-спектрофотометр

«Specord S – 100» (Analytik Jena, Германия); хромато – масс – спектрометр GCD Plus (Hewlett Packard, USA); атомно-абсорбционный спектрофотометр AA – 7000F (Shimadzu, Japan); спектрофотометр «Unico 1200» («United Products & Instruments, Inc», USA), лабораторные электронные аналитические весы «KERN 770-13» и «KERN 440-33» (KERN & Sohn GmbH, Germany); электронные аналитические весы «Shimadzu ATX-124» (Shimadzu, Japan); электронные весы A&D EK-400H (USA), центрифуга «CM-6 (RPM×1000)» (ELMI, Latvia).

**Медико-биологические исследования** гипохолестеринемической и гипополипидемической активности препаратов с производными бетулина *in vivo* проводили на белых нелинейных крысах в норме и в условиях гиперхолестеринемии. Для каждого эксперимента использовали кровь, полученную от 5 крыс (по 5 мл) в каждой исследуемой группе (интактные, на которую не оказывали воздействий; контрольные, не получающие лечение; контрольные, получающие лечение стандартным препаратом и опытные). Экспериментальная гиперхолестеринемия вызывалась внутрибрюшинным введением Твина-80. Одновременно с Твином-80 опытным группам животных перорально вводили исследуемый препарат в виде масляного раствора. Контрольная группа животных в аналогичных условиях вместо исследуемых веществ получала 0,5 мл воды (Контроль 1) или препарата сравнения (Контроль 2). Через 12 ч после внутрибрюшинной инъекции Твина-80 проводили декапитацию крысам, в соответствии с нормативными документами (А.Н. Миронов, 2012), и в сыворотке крови определяли содержание холестерина и триглицеридов. В качестве сравнения использовалось масло расторопши, представленное, главным образом, тритерпеновыми кислотами, небольшим количеством органических кислот и другими неидентифицируемыми примесями.

**Уровень холестерина и триглицеридов** в плазме крови определяли с помощью тест-наборов (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия). Фиксировали величину А (ед. опт. плотн.) – оптическая плотность образцов и калибровочной пробы, исходя из которой рассчитывается концентрация холестерина и триглицеридов. **Эффективность препарата** исследовали в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (А.Н. Миронов, 2012) на 30 самцах белых крыс массой ( $M \pm s$ )  $240 \pm 2,9$  г, при ее единовременном пероральном применении. Контроль – масло расторопши.

**Статистическую обработку** проводили по программе Statistica 7,0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

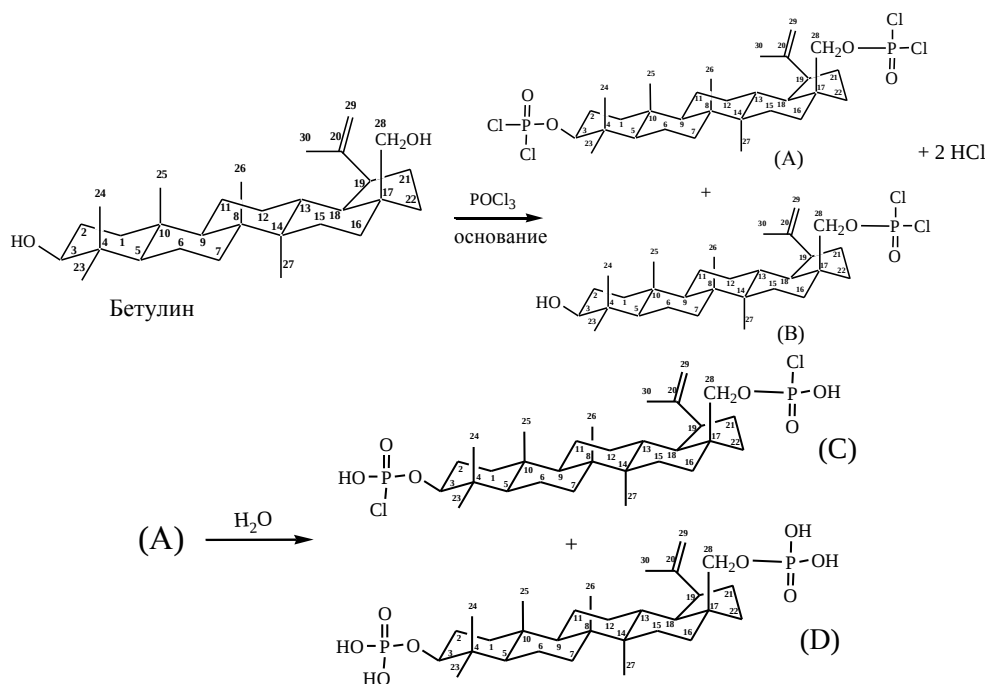
Анализ зависимости биологической активности от структуры молекулы вещества в программе PASS показал, что бетулоновая кислота, диацетат, дисукцинат и дифосфат бетулина в высокой степени проявляют гепатопротекторную (вероятность эффекта 0,732-0,968), гипополидемическую (0,414-0,781) и гипохолестеринемическую (0,401-0,734) активности.

### 1. Фосфатные производные бетулина с улучшенной гидрофильностью

Этерификацию бетулина проводили оксихлоридом фосфора в присутствии акцептора HCl (пиридина, триэтиламина, дибутиламина) при  $0 \div +10^\circ\text{C}$  и комнатной температуре, в среде дихлорметана (не смешивающийся с водой) и 1,4-диоксана (смешивающийся с водой). (Схема 1)

Выход 3,28-О-дифосфодихлорида бетулина (А) зависит от температуры, времени, соотношения между компонентами и акцептора HCl.

Хлорокись фосфора в реакционной смеси с дихлорметаном полностью удаляли при отмывании последовательно водой и раствором соды неводного слоя до нейтрального pH водной фазы. После удаления растворителя выделяли белый порошок. Реакционную смесь в диоксане выливали в стакан с измельченным льдом, выпавший белый осадок продукта промывали водой или щелочными водными или спиртовыми растворами гидроксида натрия до нейтральных pH.

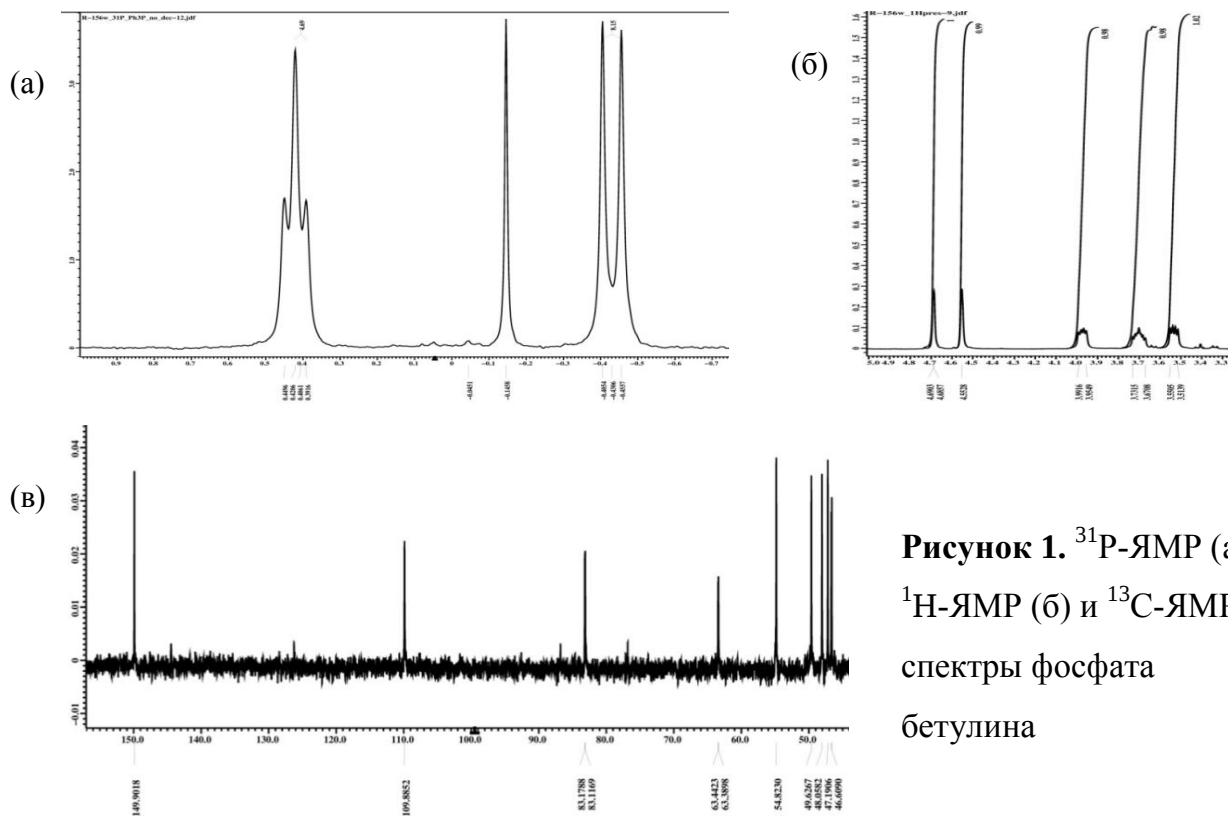


**Схема 1.** Общая схема реакции синтеза фосфорных эфиров бетулина

Максимальный выход дифосфодихлорида бетулина (А) был получен при использовании в качестве акцептора HCl пиридина, при комнатной температуре, 6-

или 12-кратном избытке хлорокси фосфора в течение суток. В процессе выделения дихлордифосфобетулина и отмывания водой образуются фосфаты бетулина.

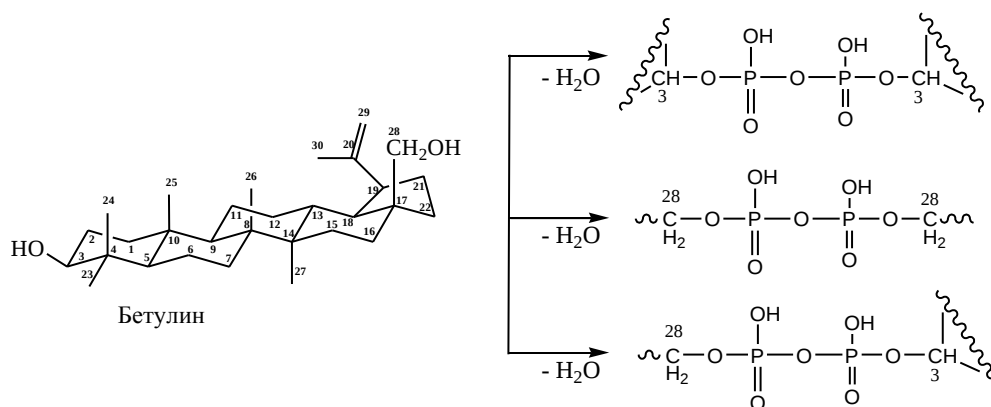
На рисунке 1 (а) представлен фрагмент спектра  $^{31}\text{P}$  ЯМР продукта реакции в DMSO-d6 в присутствии  $\text{Ph}_3\text{P}$  ( $\delta$  -6 м.д.), добавленного непосредственно перед регистрацией спектра при 30°C. Остаток фосфорной кислоты при  $\text{C}^{3b}$  бетулина проявлялся в спектре без развязки на протонах в виде дублета с  $\delta = -0,4$  м.д., при этом  $^3J_{\text{H-P}} \sim 8$  Hz типична для  $\text{CH-O-P}$ . Остаток фосфорной кислоты при  $\text{C}^{28}$  бетулина представлен в виде триплета при  $\delta = +0,48$  м.д., величина  $^3J_{\text{H-P}} \sim 4.6$  Hz характерна для  $\text{CH}_2\text{-O-P}$  фрагмента в фосфатидовой кислоте (алкил-ацил-глицеромонофосфат), в котором фрагмент  $-\text{CH}_2\text{-O-P(O)(OH)}_2$  проявляется сигналом с  $\delta = +0,55$  м.д., величина  $^3J_{\text{H-P}} \sim 6.9$  Hz. Синглет в области  $\delta = -0,27$  м.д. соответствует неорганическому фосфату.



**Рисунок 1.**  $^{31}\text{P}$ -ЯМР (а),  $^1\text{H}$ -ЯМР (б) и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (в), спектры фосфата бетулина

В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектре фосфата бетулина сигналы  $\text{C}^{28}$  и  $\text{C}^3$  в бетулине атомов смещены в более слабое поле, что также характерно для эфиров фосфорной кислоты.

В процессе выделения продукта при отмывании осадка водой возможно образование пиродифосфатов бетулина с фрагментами, представленными следующими структурами:



**Схема 2.** Варианты образования пирофосфата бетулина

**Таким образом,** нами показаны оптимальные условия синтеза: 1) растворитель 1,4-диоксан или дихлорметан; 2) акцептор HCl пиридин или триэтиламин при молярном соотношении бетулин:амин=1:2; 3) 6- или 12-кратный избыток POCl<sub>3</sub>; 4) температура – 20°C; 5) время – 24 ч.

## 2. Получение бетулоновой кислоты, диацетата и дисукцината бетулина как липофильных гиполипидемических субстанций

Методики синтеза бетулоновой кислоты (БК) и диацетата бетулина (ДАБ) широко представлены в литературе, однако надежные методики с высоким выходом и чистотой продукта отсутствуют. Получение дисукцината бетулина (ДСБ) описано в единичных источниках, в числе которых нет описания методики с достижением высокого выхода и чистоты ДСБ.

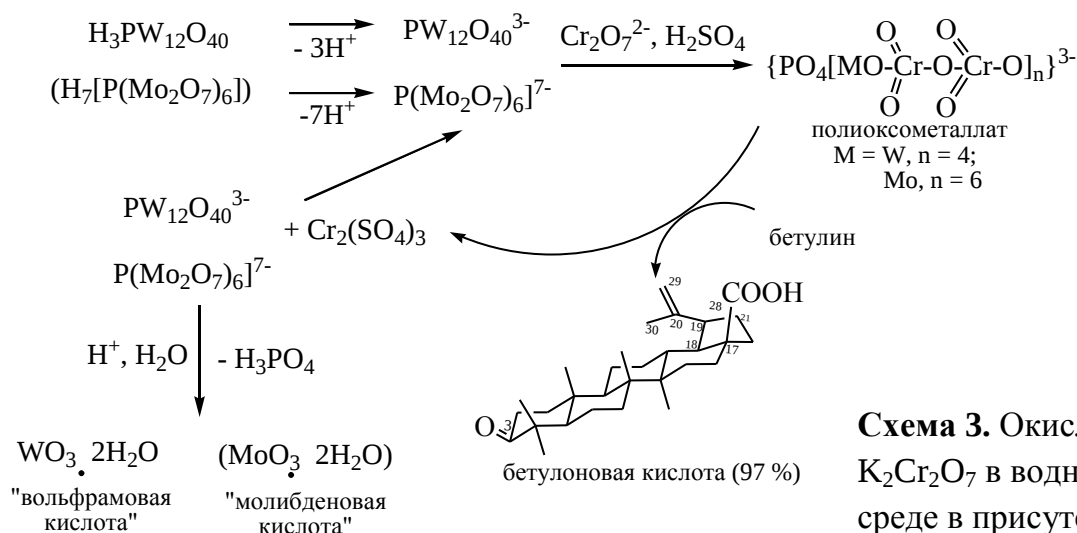
### 2.1. Синтез бетулоновой кислоты

Окисление K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в водно-ацетоновой среде при комнатной температуре (n=5) обеспечивало конверсию бетулина 52±5 %, при этом выделяли бетулоновый (18±5 %) и бетулиновый (3±3 %) альдегиды, а также продукты окисления по кратной связи в положении C-20 – C-29 (28±3 %).

Показано, что основным продуктом реакции в присутствии гетерополиоксидов (ГПО) – H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>, H<sub>7</sub>[P(Mo<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)<sub>6</sub>] в интервале концентраций 5·10<sup>-9</sup> – 5·10<sup>-6</sup> моль/л, проводящейся в течение 3 ч при комнатной температуре, является БК (чистота по ВЭЖХ 95 %). (Схема 3)

В УФ-спектре раствора бетулина в ацетоне в присутствии ГПО появлялась новая интенсивная полоса в области 300 – 330 нм, характеризующая комплексообразование, в отличие от бетулина и его производных, поглощающих в области 190 – 220 нм (этанол). Характер растворения и УФ-спектр практически не зависят от природы ГПО. В присутствии Cr<sup>6+</sup> эти комплексы, вероятно,

преобразуются в полиоксометаллаты, являющиеся более селективными окислителями по отношению к спиртовым группам бетулина. (Схема 3)



Структура БК подтверждена ИК– и ЯМР – спектрами (табл. 1, 2).

**Таблица 1.** ИК – спектры продуктов реакции бетулина с  $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$  в водно-ацетоновой среде в присутствии ГПК

| ГПК                 | Волновое число, $\nu$ см <sup>-1</sup> |                          |                          |                          |                               |
|---------------------|----------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|
|                     | 3500–3100<br>$\nu_{O-H}$               | 1725–1700<br>$\nu_{C=O}$ | 1650–1630<br>$\nu_{C=C}$ | 1050–1000<br>$\nu_{C-O}$ | 1000–800<br>$\delta_{C=CH_2}$ |
| Бетулин             | 3363<br>ш.инт.                         | –                        | 1643<br>узк.ср.          | 1028<br>узк.инт.         | 883<br>узк.инт.               |
| $H_7[P(Mo_2O_7)_6]$ | 3413<br>ш.пер.                         | 1705<br>узк.инт.         | 1643<br>узк.ср.          | –                        | 883<br>узк.инт.               |

**Таблица 2.** Данные  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР – спектров продукта окисления бетулина  $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$  в присутствии гетерополиоксидов

А.  $^1H$  ЯМР – спектры

| ГПК                 | Химический сдвиг $\delta$ , м.д. протонов |         |         |                  |                  |
|---------------------|-------------------------------------------|---------|---------|------------------|------------------|
|                     | 30-Н                                      | 19-Н    | 3-Н     | 28-Н             | 29-Н             |
| Бетулин             | 1.67 с.                                   | 2.48 м. | 3.18 дд | 3.33 д., 3.79 д. | 4.58 с., 4.70 с. |
| $H_7[P(Mo_2O_7)_6]$ | 1.64 с.                                   | 2.97 м. | –       | –                | 4.57 с., 4.70 с. |

Б.  $^{13}C$  ЯМР – спектры

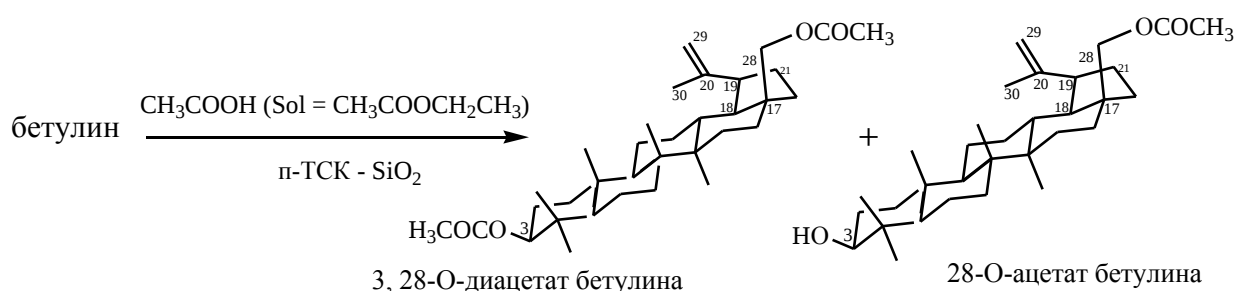
| ГПК                 | Химический сдвиг $\delta$ , м.д. |       |       |       |
|---------------------|----------------------------------|-------|-------|-------|
|                     | C-3                              | C-28  | C-20  | C-29  |
| Бетулин             | 79.1                             | 60.6  | 150.4 | 109.4 |
| $H_7[P(Mo_2O_7)_6]$ | 216.5                            | 177.3 | 150.3 | 109.5 |

Выделение БК с количественным выходом проводили через 1,5 – 3 ч добавлением воды, при этом сырец не требует сложной очистки. Хромсодержащие полиоксометаллаты после окисления бетулина превращаются в сульфат хрома (III) и регенерированные ГПК. В реакционной смеси образовывались труднорастворимые «вольфрамовая» или «молибденовая» кислоты, способные регенерироваться под действием  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

Главными преимуществами этого синтеза БК в водно-ацетоновой среде в присутствии ГПК являются проведение процесса при комнатной температуре, в отличие от реакции с реактивом Джонса, протекающей при низких температурах, и возможность получения последней с высоким выходом.

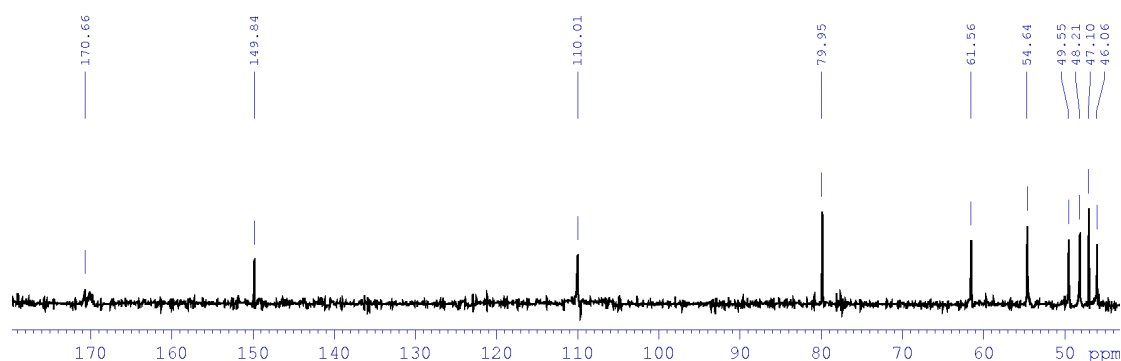
## 2.2. Синтез диацетата бетулина

Синтез диацетата бетулина (ДАБ) проводили этерификацией уксусной кислотой в присутствии связывающего агента (п-ТСК) по методике А.Н. Кислицына. (Схема 4).



**Схема 4.** Получение диацетата бетулина по Кислицыну (2000)

В качестве основных примесей по данным ОФ-ВЭЖХ-анализа выступали бетулин и моноацетат бетулина. Образование двух основных продуктов иллюстрируют ИК-спектры исходного бетулина и перекристаллизированных продуктов реакции (2 полосы для двух циклопентанпергидрофенантеновых циклов с  $\nu$  2943 и 2926  $\text{cm}^{-1}$ ). На рисунке 2 приведен фрагмент  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектра полученного ДАБ.

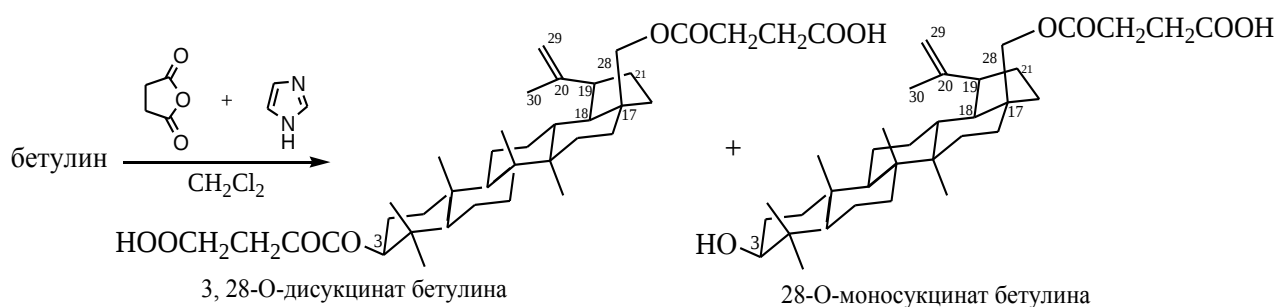


|      |        |      |       |     |        |       |       |       |        |
|------|--------|------|-------|-----|--------|-------|-------|-------|--------|
| C1   | 37.81  | C2   | 23.43 | C3  | 79.95  | C4    | 37.40 | C5    | 54.64  |
| C6   | 17.77  | C7   | 33.61 | C8  | 40.46  | C9    | 49.54 | C10   | 36.63  |
| C11  | 20.33  | C12  | 24.74 | C13 | 37.06  | C14   | 42.29 | C15   | 26.68  |
| C16  | 29.03  | C17  | 46.06 | C18 | 48.21  | C19   | 47.10 | C20   | 149.84 |
| C21  | 29.27  | C22  | 34.09 | C23 | 27.70  | C25   | 15.86 | C26   | 16.46  |
| C28  | 61.56  | C29  | 18.81 | C30 | 110.01 | CH3Ac | 20.78 | CH3Ac | 21.01  |
| COAc | 170.66 | COAc | 171.6 |     |        |       |       |       |        |

**Рисунок 2.**  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектр диацетата бетулина

### 2.3. Синтез дисукцината бетулина

Синтез дисукцината бетулина (ДСБ) проводился этерификацией янтарным ангидридом в присутствии имидазола при комнатной температуре в дихлорметане. (Схема 5)



**Схема 5.** Получение моно- и дисукцинатов бетулина

Синтез моносукцината бетулина протекал неселективно с образованием смеси моно- и дисукцината в молярном соотношении 3:2 (ЯМР- и ИК- спектры, рис. 3, 4). ДСБ образовывался с высоким выходом 85 %. Поскольку как моно-, так и ДСБ проявляют высокую гепатопротекторную активность, то можно предложить фармацевтическую субстанцию как в виде дисукцината, так и смеси сукцинатов.

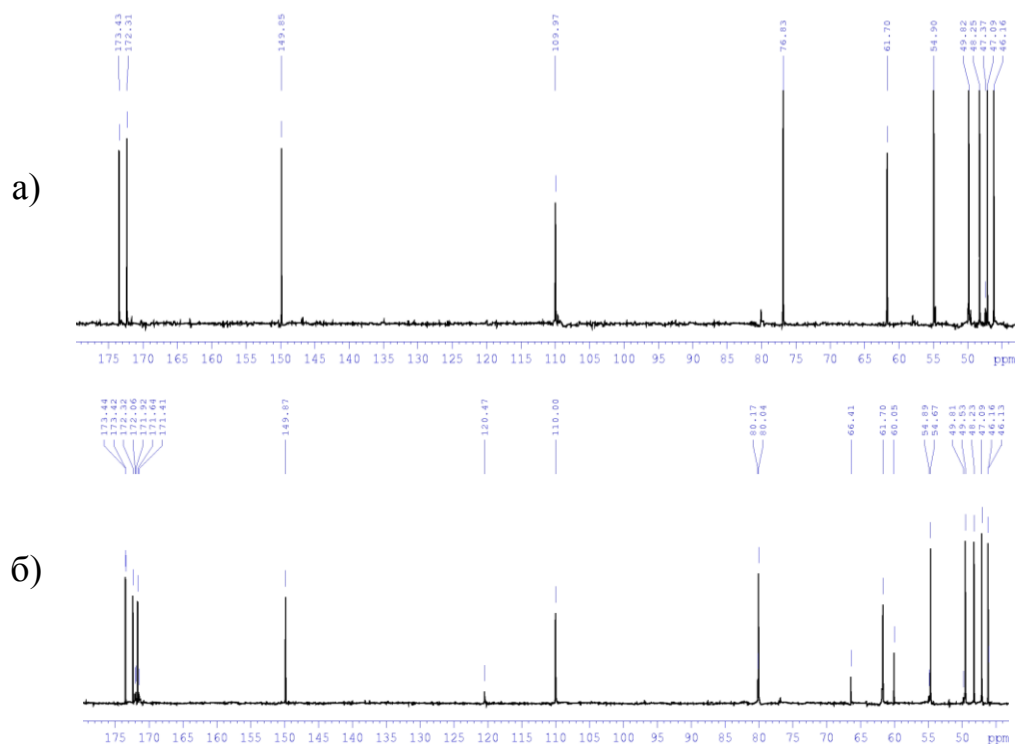


Рисунок 3.

$^{13}\text{C}$ -ЯМР спектры  
моносукцината (а)  
и дисукцината (б)  
бетулина

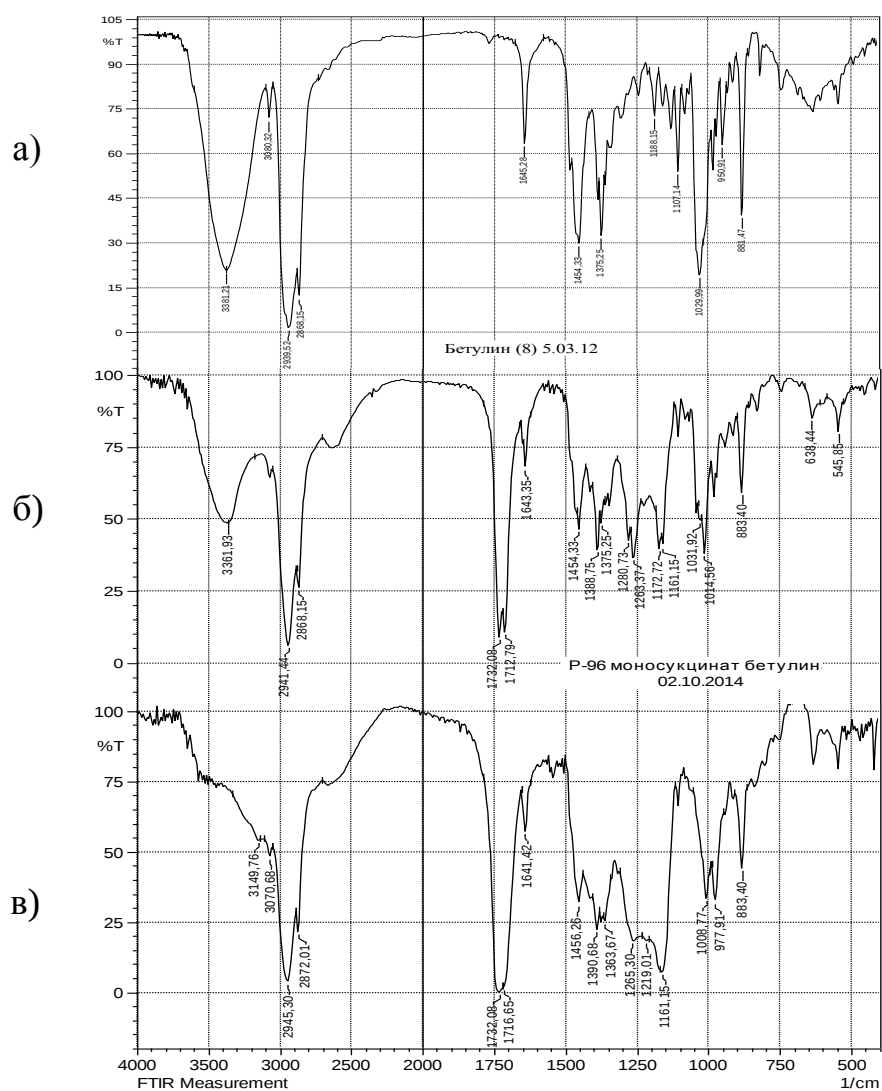


Рисунок 4. ИК-спектры

бетулина (а),  
моносукцината (б) и  
дисукцината (в) бетулина

**Таким образом,**

1) синтез БК в присутствии ГПК окислением  $K_2Cr_2O_7$  в водно-ацетоновой смеси позволяет получить целевой продукт с высоким выходом (95 %);

2) синтез ДСБ этерификацией бетулина янтарным ангидридом в присутствии имидазола при комнатной температуре имеет недостатки: гетерогенность системы и низкий выход целевого продукта;

3) синтез ДАБ ацетилированием уксусной кислотой, взамен токсичных уксусного ангидрида и пиридина, в среде этилацетата в присутствии п-ТСК при избирательном удалении воды из реакционной смеси (использование ловушки для воды и адсорбента - силикагеля) при кипячении имеет следующие преимущества: а) и моно-, и диацетат бетулина обладают высокой и близкой между собой активностью; б) выход целевого продукта достигает 95%; в) для синтеза не требуются прекурсоры; ДАБ является более подходящим для промышленного внедрения, чем ДСБ, поэтому представляется целесообразным использовать в качестве фармацевтической субстанции смесь бетулоновой кислоты и ДАБ.

### **3. Идентификация и количественное определение рассматриваемых фармацевтических субстанций**

#### **3.1. Фармацевтический анализ бетулоновой кислоты**

Неорганические примеси анализировали методом атомно-абсорбционной спектроскопии, а органические примеси - методом ТСХ на пластинках Sorbfil и ВЭЖХ.

Для разделения исходного бетулина и БК методом ТСХ использовали: подготовку пробы растворением в метаноле, элюент «гексан - этилацетат - муравьиная кислота» (20:5:1), проявитель – пары йода,  $R_f$  бетулина = 0,30,  $R_f$  БК = 0,50.

Наличие бетулонового альдегида как основной примеси в БК устанавливали по карбонильному числу, рассчитанному по реакции взаимодействия гидроксиламина солянокислого с карбонильными группами.

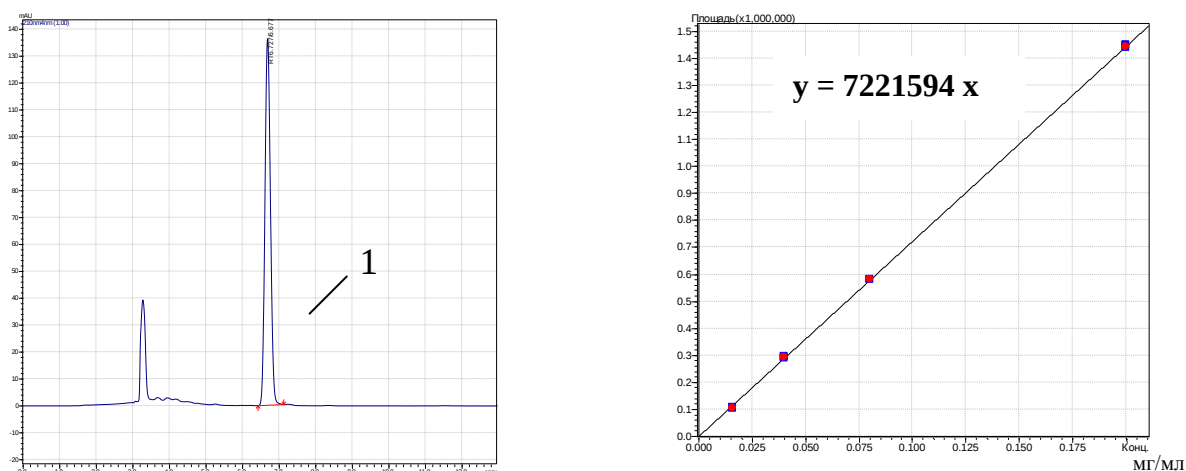
Идентификацию БК проводили по появлению малинового окрашивания в реакции на циклопентанпергидрофенантреновый цикл с ванилином, а также методами  $^{13}C$ -ЯМР-,  $^1H$ -ЯМР-, ИК-спектроскопии и ВЭЖХ с использованием стандартных образцов.

Подлинность также устанавливали по температуре плавления и поляризуемости: **Т. пл.** 250 – 252 °С,  $[\alpha]_D^{20} +12,2^\circ$  (с 0.09,  $CHCl_3$ ), которые совпадали с

литературными данными. Кроме того, подлинность подтверждалась характеристиками масс-спектра:  $m/z$  ( $I_{отн.}$ , %): 454 (58)  $[M]^+$ , 248 (64), 219 (42), 205 (76), 189 (88), 136 (100), 121 (90).

На рисунке 5 приведена ВЭЖ-хроматограмма, полученная при количественном определении бетулоновой кислоты. Время удерживания пика 6,65 мин соответствует бетулоновой кислоте.

Для количественного определения БК использовали растворы образцов сравнения, концентрация которых соответствовала 0,016; 0,040; 0,080 и 0,200 мг/мл, по которым был построен градуировочный график.



**Рисунок 5. ВЭЖ-хроматограмма БК (1) и градуировочный график**

**Условия хроматографирования:** Колонка Discovery® C18, 25 см x 4.6 mm, 5  $\mu$ m (Supelco); объем пробы 20 мкл; скорость потока – 1,0 мл/мин; подвижная фаза: ацетонитрил – вода (90:10, об. %); диодно-матричный УФ детектор –  $\lambda=196$  и 210 нм; температура - 40°C; время выхода – 6,65 мин. Пик при  $t_r=3,23$  мин соответствует примеси в ацетонитриле.

Количественное определение остаточных органических растворителей проводили методом ГЖХ. Их содержание соответствовало требованиям ОФС «Остаточные органические растворители» ГФ XII.

### 3.2. Фармацевтический анализ диацетата бетулина

Идентификацию ДАБ проводили методами  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-, ИК-спектроскопии и ВЭЖХ (время выхода пика 20,79 мин на ВЭЖ-хроматограмме соответствует ДАБ), а также качественной реакцией с ванилином в серной кислоте.

Количественное определение проводили методом ВЭЖХ с использованием градуировочного графика, построенного по модельным растворам образцов сравнения (0,025; 0,05 и 0,075 мг/мл). Вычисленное значение составило 98,3% чистоты.

#### 4. Разработка гипополидемического средства на основе эфиров бетулина и бетулоновой кислоты в масле семян тыквы

##### 4.1. Обоснование состава гипополидемического препарата

Основными действующими веществами препарата были выбраны БК и ДАБ, либо их эквимольная смесь. Выбор этих веществ обусловлен как простотой препаративного синтеза, надежной идентификацией примесей, их низкой токсичностью, так и высокой гипополидемической и гипохлестеринемической активностью БК и ДАБ. В таблице 3 приведены основные преимущества и недостатки синтезов производных бетулина.

**Таблица 3.** Достоинства и недостатки получения производных бетулина

|                            | <b>Достоинства</b>                                                                                                                                                              | <b>Недостатки</b>                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Фосфат бетулина</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>Высокая гидрофильность</li> </ul>                                                                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>Неустойчивость дифосфодихлорида</li> <li>Высокое содержание примесей</li> <li>Легкость образования труднорастворимых пирофосфатов</li> <li>Длительность синтеза (24 ч)</li> <li>Возможность образования сольватов</li> </ul>                     |
| <b>Дисукцинат бетулина</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Возможность перевода в более растворимую в воде динатриевую соль</li> <li>Высокая липофильность</li> </ul>                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>Сложность выделения сырца</li> <li>Малый выход чистого продукта за счет трудоемкой очистки</li> <li>Высокое содержание примеси моносукцината бетулина</li> <li>Длительность синтеза (12 ч)</li> <li>Возможность образования сольватов</li> </ul> |
| <b>Бетулоновая кислота</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Длительность синтеза (1,5 ч)</li> <li>Простота выделения сырца</li> <li>Высокая липофильность</li> </ul>                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Использование соединений Сг<sup>VI</sup></li> </ul>                                                                                                                                                                                              |
| <b>Диацетат бетулина</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Простота синтеза</li> <li>Длительность синтеза (4 ч)</li> <li>Высокий выход продукта</li> <li>Минимальное количество примесей</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Возможность образования гидратов</li> </ul>                                                                                                                                                                                                      |

Для обеспечения хорошей биодоступности БК и ДАБ нами предложено использовать масло семян тыквы (МСТ), которое применяется в составе гипополидемических БАД. МСТ проявляет антикоагуляционный эффект, снижение сахара, гепатопротекторное действие, что обусловлено его жирно-кислотным составом, представленным 80% линолевой и олеиновой кислотами, антиоксидантами (токолами и каротиноидами), а также наличием в его составе фитостеролов,

основным представителем которых является  $\beta$ -ситостерол. Кроме того, фитостеролы (кампестерол,  $\beta$ -ситостерол и их глюкопиранозиды) в МСТ по отношению к изучаемым соединениям: БК и ДАБ, способны выполнять роль вектора доставки в лекарственной форме.

Так как при хранении в масле происходит уменьшение концентрации ненасыщенных жирных кислот, каротиноидов и токолов, то в качестве стабилизатора МСТ предложено использовать тимол как масло-растворимый антиоксидант. Он способен ингибировать реакцию перекисного окисления липидов, прерывая цепь свободно-радикальных реакций.

Показано, что концентрация каротиноидов МСТ в присутствии тимола практически не изменялась в условиях ускоренного старения при температуре 40°C. (Табл. 4) Исходное МСТ содержит 6 мг%  $\alpha$ -токоферола, около 50 мг% смеси  $\gamma$ -токоферола и  $\gamma$ -токотриенола, 105-150 мг%  $\beta$ -ситостерола.

**Таблица 4.** Изменение состава масла семян тыквы при хранении на воздухе при 25°C

|           | Сумма токолов,<br>мг% |               | Каротиноиды, мг% |               | Фитостеролы, мг% |               |
|-----------|-----------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------|
|           | $\tau=0$              | $\tau=3$ мес. | $\tau=0$         | $\tau=3$ мес. | $\tau=0$         | $\tau=3$ мес. |
| МСТ       | 56.0                  | 28.0          | 0.82             | 0.50          | 130              | 75            |
| МСТ+тимол | 56.0                  | 54.2          | 0.82             | 0.78          | 130              | 130           |

Нами предложен гиполипидемический препарат, содержащий БК и/или ДАБ в МСТ, при следующем соотношении компонентов, масс. %: БК и/или ДАБ 1,0; тимол 0,1; МСТ до 100.

Предложенный состав может быть использован для изготовления различных лекарственных форм на мазевой основе, в частности, мази, кремы, а также капсул и суппозиторий. Получено положительное решение о выдаче патента 19.02.2016 (заявка № 2014143673 от 30.10.2014).

#### **4.2. Исследование гипохолестеринемического и гиполипидемического действия препарата в эксперименте на крысах**

В таблицах 4 и 5 приведены результаты исследования гипохолестеринемической и гиполипидемической активности предлагаемого препарата в эксперименте на крысах.

Как показали опыты (Табл. 5, 6), в результате введения Твина-80 у крыс контрольной группы уровень холестерина в крови повысился на 292.9%, а уровень

триглицеридов - на 37.3% по сравнению с интактными животными. Через 12 часов после введения одновременно с Твином-80 изучаемых составов препаратов во всех случаях отмечалось снижение в крови крыс концентрации как холестерина, так и триглицеридов. В качестве сравнения в группе Контроль 2 животным вводили масло расторопши, богатое тритерпеновыми кислотами. Полученные нами данные показали достоверное уменьшение уровня холестерина и триглицеридов в крови животных по сравнению с группами Контроль 1 (группа без лечения) и Контроль 2 (лечение маслом расторопши).

**Таблица 5.** Влияние БК и ДАБ в МСТ на содержание холестерина в крови

| Группа                             | Содержание холестерина,<br>ммоль/л |                       | Изменение, % |
|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|--------------|
|                                    | Твин-80                            | Твин-80 +<br>препарат |              |
| Интактные, n=5                     | 3.10±0.67                          | -                     | -            |
| Контроль 1, n=5                    | 12.18±0.64                         | -                     | +292.9±20.6  |
| Контроль 2<br>Масло расторопши n=5 | -                                  | 9.11±0.71             | -25.2±5.8    |
| Препарат с ДАБ, n=5                | -                                  | 7.32±0.80             | -39.9±6.6    |
| Препарат с БК, n=5                 | -                                  | 6.03±0.75             | -50.5±6.2    |
| Препарат с БК+ДАБ, n=5             | -                                  | 5.35±0.67             | -56.1±5.5    |

**Таблица 6.** Влияние БК и ДАБ в МСТ на содержание триглицеридов в крови

| Группа                             | Содержание триглицеридов,<br>ммоль/л |                       | Изменение, % |
|------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------|
|                                    | Твин-80                              | Твин-80 +<br>препарат |              |
| Интактные, n=5                     | 0.64±0.15                            | -                     | -            |
| Контроль 1, n=5                    | 0.88±0.15                            | -                     | +37.3±18.8   |
| Контроль 2<br>Масло расторопши n=5 | -                                    | 0.59±0.15             | -32.9±17.0   |
| Препарат с ДАБ, n=5                | -                                    | 0.44±0.14             | -50.0±15.9   |
| Препарат с БК, n=5                 | -                                    | 0.45±0.11             | -48.9±12.5   |
| Препарат с БК+ДАБ, n=5             | -                                    | 0.41±0.07             | -53.4±8.0    |

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых нами исследований, установлены препаративные методики синтеза бетулоновой кислоты и диацетата бетулина. Показано, что производные бетулина обладают высокой гиполипидемической и гипохолестеринемической активностью. Приведённые ниже выводы позволяют конкретно оценить полученные в диссертационной работе данные, которые могут быть использованы при разработке новых лекарственных средств.

### Выводы.

1. Обоснован выбор производных бетулина как потенциальных гиполипидемических субстанций и компонентов препарата на основе анализа литературных данных и расчетов в программе PASS.

2. Усовершенствованы методики получения бетулоновой кислоты, диацетата и сукцинатов бетулина. Максимальный выход (93-97%) и чистота (99,5%) бетулоновой кислоты получены окислением бетулина системой «бихромат калия – серная кислота» в присутствии фосфорновольфрамовой или фосфорномолибденовой гетерополикислот при комнатной температуре. Синтез диацетата бетулина (выход не менее 90 %) проведен ацетилированием уксусной кислотой в среде этилацетата в присутствии связывающего агента при избирательном удалении воды из реакционной смеси силикагелем. Дисукцинат бетулина (85 %) получен этерификацией бетулина янтарным ангидридом в присутствии имидазола в среде дихлорметана при комнатной температуре.

3. Разработан новый синтез 3,28-дифосфата бетулина (выход не менее 90 %) этерификацией оксихлоридом фосфора в органическом растворителе в присутствии акцептора хлористоводородной кислоты (третичные амины) при молярном соотношении бетулин : акцептор  $\text{HCl}$  :  $\text{POCl}_3$  = 1:2:12 (или 1:2:6) при комнатной температуре. Показана возможность получения натриевых солей 3,28-дифосфатов бетулина.

4. Разработаны методы идентификации (качественные реакции, ИК-,  $^1\text{H}$ -ЯМР- и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопия, ВЭЖХ) и количественного определения (ВЭЖХ, ИК-спектроскопия) бетулоновой кислоты, диацетата и дисукцината бетулина.

5. Обоснован выбор масла семян тыквы в качестве среды гиполипидемического препарата производных бетулина.

6. Разработан и обоснован состав гиполипидемического препарата, содержащей бетулоновую кислоту (1 %) или диацетат бетулина (1 %), или их

смесь (1 %), и тимол (0,5 %) в масле семян тыквы. В эксперименте на белых нелинейных крысах при внутрибрюшинном введении Твина-80 доказано гипохолестеринемическое и гиполипидемическое действие предлагаемого препарата.

7. Разработаны нормы качества и проекты фармакопейных статей на потенциальные фармацевтические субстанции: бетулоновая кислота и диацетат бетулина, и на гиполипидемический препарат «Бетулитим», содержащий производные бетулина и тимол в масле семян тыквы, в виде капсул.

### **Практические рекомендации**

Разработанные проекты фармакопейных статей на новые фармацевтические субстанции «Бетулоновая кислота» и «Диацетат бетулина», а также на новый гиполипидемический препарат «Бетулитим» могут быть внедрены в производственный процесс фармацевтических предприятий. Разработанные методики анализа компонентов капсул с производными бетулина в масле семян тыквы могут быть внедрены в лабораторные практикумы, учебный процесс и научно-исследовательскую работу ВУЗов.

**Перспективы дальнейшей разработки темы** заключаются в промышленном производстве гиполипидемических и гипохолестеринемических препаратов в виде различных лекарственных форм.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации:**

1. Vorobyova, O. A. Analysis of the Components of Pumpkin Seed Oil in Suppositories and the Possibility of Its Use in Pharmaceuticals / O.A. Vorobyova, A.E. Bolshakova, R.A. Pegova, O.V. Kol'chik, I.N. Klabukova, E.V. Krasilnikova, N.B. Melnikova // **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. – 2014. – №6 (5). – P. 1106-1116.
2. Пегова, Р.А. Растительные масла. Состав и перспективы использования масла семян тыквы *cucurbita* перо в терапии (обзор) / Р.А. Пегова, О.А. Воробьева, О.В. Кольчик, А.Е. Большакова, О.Е. Жильцова, Н.Б. Мельникова // **Медицинский альманах**. – 2014. – № 2 (32). – С. 127-134.
3. Пегова, Р.А. Фармацевтические композиции гиполипидемического действия эфиров уксусной и янтарной кислот бетулина / Р.А. Пегова, О.Е. Жильцова, И.Н. Клабукова, И.В. Мухина, Р.Д. Лапшин, И.В. Жданович, Н.Б. Мельникова // **Медицинский альманах**. – 2015. – № 3 (38). – С. 216-219.
4. Пегова Р.А. Препаративный синтез диацетата и сукцинатов бетулина - потенциальных фармацевтических субстанций гиполипидемического действия /

Р.А. Пегова, М.В. Гуленова, О.Е. Жильцова, И.Н. Клабукова, Н.Б. Мельникова // **Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.** – 2015. – № 10. – С. 304-310.

5. Melnikova, N. Potential Effective Lipid-Lowering Medicine - Betulonic Acid Mild Selective Synthesis and Pharmacological Activity / N. Melnikova, R. Pegova, O. Zhiltsova, T. Kiseleva, I. Klabukova, M. Gulenova, V. Vasin, B. Tanaseychuk // **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.** – 2015. – Vol.34 Issue 2. – P. 256-264.

6. Пегова, Р.А. Создание новых противовоспалительных и гепатопротекторных средств на основе бетулоновой кислоты / Р.А. Пегова // МедиАль. Современные решения актуальных научных проблем в медицине: материалы I Всероссийской XII научной сессии молодых ученых и студентов с международным участием. – 2013. – №1 (6). – С. 114-115.

7. Пегова, Р.А. Биоактивный комплекс бетулоновой кислоты и компонентов масла семян тыквы как гипополидемическое средство / Р.А. Пегова, О.Е. Жильцова, И.Н. Клабукова, Н.Б. Мельникова // Теоретические и прикладные аспекты современной науки: сборник научных трудов по материалам II Международной научно-практической конференции. – Белгород, 2014. – Часть 2. – С. 151-158.

8. Лебедева, Р.А. Особенности анализа бетулоновой кислоты как потенциального лекарственного вещества и прекурсора / Р.А. Лебедева // Актуальные вопросы медицины в современных условиях: сборник научных трудов по итогам III Международной научно-практической конференции. – Санкт-Петербург, 2016. – Выпуск III. – С. 208-213.

9. Лебедева, Р.А. Разработка гипополидемического препарата сукцинатов бетулина / Р.А. Лебедева, Е.В. Моисеева // Приоритетные направления развития науки и образования: материалы VIII Международной научно-практической конференции. – Чебоксары, 2016. – № 1 (8). – С. 82-84.

10. Лебедева, Р.А. Идентификация и количественное определение диацетата бетулина как потенциальной фармацевтической субстанции / Р.А. Лебедева, Д.С. Малыгина // Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты: сборник материалов XXIV Международной научно-практической конференции. – Новосибирск, 2016. – С. 155-160.