

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
НИЖЕГОРОДСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЛЕБЕДЕВА РЕГИНА АЛЕКСАНДРОВНА

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

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Мельникова Н.Б.

Нижний Новгород – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	12
1.1. Анализ фармацевтического рынка гиполипидемических и гипохолестеринемических лекарственных средств	12
1.2. Масла как источники фитостеролов, обладающих гиполипидемическими свойствами	20
1.3. Бетулин и его производные как потенциальные лекарственные вещества ..	23
1.3.1. Биологическая активность производных бетулина	23
1.3.2. Синтетические подходы к препаративным методикам получения производных бетулина с предполагаемым гиполипидемическим действием.....	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1. Объекты, материалы и методы исследования.....	40
2.2. Выделение и идентификация бетулина	42
2.3. Синтез бетулонового альдегида (образец сравнения для ВЭЖХ).....	43
2.4. Методика синтеза фосфата бетулина.....	44
2.5. Методика синтеза моно- и дисукцинатов бетулина	45
2.6. Методика синтеза диацетата бетулина	46
2.7. Синтез бетулоновой кислоты.....	46
2.8. Методика определения карбонильного числа.....	47
2.9. Анализ масла семян тыквы	48
2.10. Определение неорганических примесей методом ААС	49
2.11. Исследование гиполипидемической и гипохолестеринемической активностей предлагаемого препарата	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	52
3.1. Расчет фармакологической активности производных бетулина в программе PASS	53

3.2. Фосфатные производные бетулина с улучшенной гидрофильностью.....	55
3.2.1. Синтез и свойства фосфатов бетулина	56
3.3. Синтез бетулоновой кислоты и эфиров бетулина	74
3.3.1. Синтез бетулоновой кислоты как потенциальной фармацевтической субстанции в присутствии ГПК.....	74
3.3.2. Синтез диацетата бетулина	82
3.3.3. Синтез дисукцината бетулина	88
3.4. Идентификация и количественное определение потенциальных фармацевтических субстанций.....	95
3.4.1. Методики идентификации и количественного определения бетулоновой кислоты и возможных примесей.....	95
3.4.2. Методики установления подлинности и количественного определения фармацевтической субстанции – диацетата бетулина	101
3.4.3. Методики идентификации и количественного определения дисукцината бетулина	103
ГЛАВА 4. НОВЫЕ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ЭФИРОВ БЕТУЛИНА И БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ В МАСЛЕ СЕМЯН ТЫКВЫ	107
4.1. Обоснование состава препарата, обладающего гиполипидемическим и гипохолестеринемическим действием.....	107
4.2. Исследование гипохолестеринемического и гиполипидемического действия препарата в эксперименте на крысах	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	119
Приложение 1. Проект фармакопейной статьи «Бетулоновая кислота».....	134
Приложение 2. Проект фармакопейной статьи «Диацетат бетулина»	143
Приложение 3. Проект фармакопейной статьи «Бетулитим»	152
Приложение 4. Акты внедрения	160

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия

БК – бетулоновая кислота

ГЖХ – газо-жидкостная хроматография

ГПК – гетерополикислота

ДАБ – диацетат бетулина

ДГ – 1,2-дизамещенные глицериды

ДМСО – диметилсульфоксид

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия

КЧ – карбонильное число

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности

МСТ – масло семян тыквы

МТБЭ – метил-третбутиловый эфир

ОФ- ВЭЖХ – обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ТГ – триглицериды

ТГФ - тетрагидрофуран

УФ-спектроскопия – ультрафиолетовая спектроскопия

ХС – холестерин

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) – программа прогнозирования фармакологической активности веществ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

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. [72] 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. [8, 31, 40, 47, 50, 52, 67, 68, 85] Общность свойств, вероятно, обусловлена близкими механизмами биотрансформации. Так, бетулиновая кислота под действием ряда микроорганизмов и грибов превращается в бетулоновую кислоту и среди продуктов дальнейшей их биотрансформации обнаруживаются одни и те же метаболиты. [62, 66, 78, 81]

Сопоставление влияния бетулина и бетулиновой кислоты на противоопухолевую активность показало, что бетулиновая кислота, как противоопухолевый агент, существенно уступает своему более липофильному предшественнику – бетулину с двумя спиртовыми группами, за счет совместного действия комплексов или ассоциатов бетулина с холестеролом. [82] Взаимодействие бетулина с холестеролом, вероятно, близко к доказанной ассоциации β -ситостерола с холестеролом [83], которая в конечном счете приводит к гиполипидемическому эффекту, поскольку для достижения последнего немаловажным является большая липофильность тритерпеноида.

Однако, несмотря на многочисленные публикации, посвященные исследованию фармакологического действия производных бетулиновой кислоты, гиполипидемических лекарственных средств на основе эфиров бетулина на фармацевтическом рынке не представлено.

Сложность создания ЛФ является плохая растворимость бетулина как в воде, так и в липофильных средах, снижающая его биодоступность. Увеличение биодоступности бетулина и его производных возможно за счет векторной доставки каротиноидами, токолами, фитостеролами и некоторыми биологически активными веществами. Перспективными представляются среды, богатые вышеупомянутыми веществами, к которым относятся растительные масла, в том числе масло семян тыквы. Ранее в работах Н.Е. Полякова доказано образование комплексов включения каротиноидов с глицеризиновой кислотой. [95, 96]

Степень разработанности темы. Синтез различных эфиров бетулина широко представлен в работах отечественной школы 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 в работах Василенко на примере диацетата бетулина. [3]

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

Целью настоящей работы является разработка гипополидемического препарата производных бетулина, совершенствование методов их получения, стандартизации и контроля качества препарата.

Для достижения поставленной цели необходимо решить **следующие задачи:**

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 гипополипидемические свойства, как среды в препарате производных бетулина.

6. Разработка состава гипополипидемического препарата, содержащего в качестве действующих веществ производные бетулина в масле семян тыквы и исследование гипохолестеринемического и гипополипидемического действий препарата с производными бетулина в эксперименте на животных.

7. Установление нормативов качества и разработка проектов фармакопейных статей новых субстанций и гипополипидемического препарата.

Научная новизна.

- Впервые разработан гипополипидемический 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 гипополипидемического препарата в виде капсул.

Научно-практическая значимость и внедрение результатов исследования. Обоснован состав гипополипидемического препарата, содержащего производные бетулина. Изучено гипохолестеринемическое и гипополипидемическое действие разработанного препарата в эксперименте на животных. Представлены

результаты по разработке норм качества гипополидемического препарата. Разработаны проекты фармакопейных статей на субстанции и гипополидемический препарат производных бетулина. Разработанные методики анализа компонентов гипополидемического 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 государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акты внедрения от 21.12.2015 г.), государственном бюджетном образовательном учреждении среднего профессионального образования Нижегородской области «Нижегородский медицинский базовый колледж» (акт внедрения от 21.12.2015 г.), а также в государственном автономном учреждении здравоохранения Нижегородской области «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств» (акт внедрения от 21.12.2015).

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-, ^1H -, ^{13}C -, ^{31}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».

На защиту выносят положения:

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 паспорту специальности. Диссертационная работа по своим целям, задачам, содержанию, научной новизне и методам исследования

соответствует п.1 «Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ», п.2 «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств» и п.3 «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества» паспорта специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Апробация работы. 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); Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты современной науки» (Белгород, 2014), первом региональном фестивале молодежных инноваций «ИнноФест» (Нижний Новгород, 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. 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 гиполипидемическом 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 и приложения. Работа изложена на 163 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц, 19 рисунков, 22 схемы.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Анализ фармацевтического рынка гиполипидемических и гипохолестеринемических лекарственных средств

Гиперлипидемии – группа патологических состояний, сопровождающихся ростом уровня плазменных холестерина (ХС) и (или) триглицеридов (ТГ) вследствие нарушения синтеза, транспорта и расщепления липопротеинов.

При заболеваниях сердечно-сосудистой системы для лечения и в качестве профилактики применяют лекарственные средства, регулирующие уровень холестерина, триглицеридов, фосфолипидов и, в конечном счете, липопротеинов, являющихся переносчиками липидов в крови.

Липопротеины разделяют на несколько классов в зависимости от их физиологической роли и физико-химических свойств: липопротеины низкой плотности (ЛПНП) – отвечают за транспорт как самого холестерина, так и его эфиров; липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) – транспортируют эндогенные триглицериды; липопротеины высокой плотности (ЛПВП) – в большей степени отвечают за перенос холестерина и фосфолипидов.

Таким образом, ЛПОНП переносят холестерин и эндогенные триглицериды, а ЛПНП передают их стенкам кровеносных сосудов. Это способствует развитию или отягощению атеросклероза. В свою очередь ЛПВП транспортируют холестерин из тканей, главным образом, из стенок сосудов. [44]

Регуляция уровня ХС в крови зависит от трёх механизмов метаболизма: абсорбции пищевого ХС, синтеза эндогенного ХС и экскреции/реабсорбции билиарного ХС. Кроме того, уровень ХС определяется повышением продукции и/или снижением катаболизма ХС, которое приводит к его избыточному накоплению.

Корректировать нарушения липидного обмена можно средствами, к которым относятся статины, секвестранты желчных кислот, ингибиторы всасывания

холестерина в кишечнике (эзетимиб), фибраты, ниацин и препараты, содержащие омега 3-полиненасыщенные жирные кислоты. [2] В таблице 1.1 представлена сравнительная характеристика основных представителей различных групп гиполипидемических препаратов, представленных на фармацевтическом рынке.

Однако, наиболее эффективна комплексная терапия заболеваний, сопровождающихся или обусловленных нарушениями липидного обмена.

Таблица 1.1.

Сравнительная характеристика гиполипидемических ЛС различных групп

Торговое название	Действующее вещество	Фарм. группа	Форма выпуска, производитель	№	Сут. доза
Статины					
Аторвастатин	аторвастатина кальция тригидрат	ЛС	Табл. Россия	30	10-80 мг (1-2 табл.)
Зокор	симвастатин	ЛС	Табл. Нидерланды	28	10 мг (1 табл.)
Кардиостатин	ловастатин	ЛС	Табл. Россия	30	10-40 мг (1-2 табл.)
Овенкор	симвастатин	ЛС	Табл. Россия	30	
Никотинаты					
Компламин	ксантинола никотинат	ЛС	Драже Россия	20	1,5-3 г (3-6 драже)
Эндурацин	никотиновая кислота	ЛС	Табл.	100	0,5-1,5 г (1-3 табл.)
Секвестранты желчных кислот					
Гуарем	хьюаровая смола	ЛС	Саше Финляндия	30 50	10-25 г (2-5 саше)
Квестран	колестирамин	ЛС	Саше Германия	50	4-24 г (1-6 саше)

Таблица 1.1. Продолжение.

Торговое название	Действующее вещество	Фарм. группа	Форма выпуска, производитель	№	Сут. доза
Фибраты					
Безалип	безафибрат	ЛС	Табл. Австрия	30	600 мг (3 табл.)
Грофибрат	фенофибрат	ЛС	Капс.	50	600 мг (3 капс.)
Липантил 200 М	фенофибрат микронизиро- ванный	ЛС	Капс. Франция	30	200 мг (1 капс.)
Трайкор	фенофибрат микронизиро- ванный	ЛС	Табл. Франция	30	145-160 мг (1 табл.)
Другие гиполипидемические средства					
Алликор	чесночный порошок	БАД	Табл. Россия	200 100 60	600 мг (2 табл.)
Ксеникал	орлистат	ЛС	Капс. Швейцария	21 42	360 мг (3 табл.)
Ксеналтен	орлистат	ЛС	Капс.	21 42 84	360 мг (3 табл.)
Орсотен	орлистат	ЛС	Капс. Россия	21 42	360 мг (3 табл.)
Урсо-100	урсодезоксис- холевая кислота	ЛС	Табл.	1000	200-500 мг (2-5 табл.)
Урсофальк	урсодезоксис- холевая кислота	ЛС	Капсулы Германия	50	500- 1500 мг (2-6 капс.)
Липобон	эзетимиб	ЛС	Табл. Турция	30 60 90	10 мг (1 табл.)
Эзетрол	эзетимиб	ЛС	Табл. Бельгия	28	10 мг (1 табл.)

Следует отметить, что особый интерес вызывает комплексная терапия лекарственными компонентами природного происхождения. К ним можно отнести некоторые растительные масла, состав которых богат ненасыщенными жирными кислотами, фосфолипидами, стеринами и т.д. Каждый компонент может корректировать отдельную составляющую липидного спектра крови. [22] К таким маслам относятся оливковое (богато олеиновой кислотой), льняное (основные компоненты: α -линоленовая и олеиновая кислоты), амарантовое (высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот семейства омега-3 и омега-6: линолевая, линоленовая кислоты) и масло семян тыквы (состав представлен каротиноидами, токоферолами, стеролами, ненасыщенными жирными кислотами и т.д.).

Основным классом ЛС, применяющимся для лечения гиперлипидемий и атеросклероза, являются статины. В РФ зарегистрировано 6 препаратов этого класса, которые можно разделить по способу получения на полностью синтетические препараты (аторвастатин, розувастатин и флувастатин) и препараты, полученные ферментацией грибов (симвастатин, ловастатин, правастатин). [6]

Снижая уровень ХС-ЛПНП, статины при этом увеличивают интенсивность катаболизма ЛПОНП, в составе которых есть ТГ. Установлено, что при терапии статинами уровень ТГ снижается в среднем на 15-20%.

Статины рассматривают как ингибиторы фермента синтеза холестерина - гидрокси-метил-глутарил коэнзим А-редуктазы, тем самым они способствуют снижению пула (депо) холестерина в клетках печени. Они истощают внутриклеточные запасы ХС-ЛПНП и регулируют рецепторы ЛПНП печени, этим статины снижают содержание ХС-ЛПНП. [22]

Второй важной и значимой группой гиполипидемических средств являются производные циклопентанпергидрофенантрена, например, из класса желчных кислот (урсодезоксихолевая кислота), выделяемых из растительного сырья с последующей химической модификацией. Препараты этого ряда имеют преимущества по сравнению со статинами как по меньшей токсичности, так и по

воздействию на липидный спектр, оказывая при этом гепатопротекторное действие.

Обобщая данные по анализу фармацевтического рынка гиполипидемических ЛС, полученных из природного растительного сырья, можно отметить, что препаратов такого рода крайне мало (менее 50 наименований) и основным представителем является урсodeзоксихолевая кислота.

Урсodeзоксихолевая кислота является желчной кислотой, которая в норме содержится в желчи человека в количестве 5 %. Однако ее содержание в желчи медведя достигает 50%. Таким образом, в настоящее время существуют только два способа получения урсodeзоксихолевой кислоты: синтетический метод и канюляция желчного пузыря медведей с последующей добычей естественной желчи. [19] Последний способ очень трудоемкий, негуманный и малопродуктивный, поэтому фармацевтические компании получают данное биологически активное вещество путем ее синтеза из холевой кислоты.

Урсodeзоксихолевая кислота, образуя безопасные комплексы с токсичными желчными кислотами, нейтрализует их и предотвращает повреждения мембран клеток. Также она уменьшает всасывание холестерина в кишечнике, влияя на обратное всасывание желчных кислот из кишечника в желчь, чем обусловлен ее гипохолестеринемический эффект. Урсodeзоксихолевая кислота повышает растворимость кристаллов холестерина, способствует разрушению желчных камней, препятствует образованию новых холестериновых конкрементов, а также уменьшает образование холестерина непосредственно в печени. Кроме того, урсodeзоксихолевая кислота обладает иммуномодулирующими свойствами, нормализуя активность лимфоцитов и нарушая экспрессию антигенов на клетках печени и печеночных протоков. [14]

Большой интерес в плане потенциальных действующих веществ гиполипидемического действия представляют тритерпеноиды класса лупана – производные бетулина, близкие к урсodeзоксихолевой кислоте по химической природе. В настоящее время на фармацевтическом рынке уже имеются средства с действующим веществом – бетулином или экстрактом бересты березы

(Таблица 1.2.), однако, отсутствуют препараты с эфирами и оксо-производными бетулина, которые обладают большей фармакологической активностью.

Таблица 1.2.

Средства с бетулином в качестве действующего вещества
на фармацевтическом рынке России

<i>Название фирмы</i>	<i>Наименование продукта</i>	<i>Фарм. действие</i>
ООО «Березовый мир»	Диабетулайн-Ф (БАД)	Для профилактики и комплексного лечения диабета
	Вирбетол (БАД) (Суперантитокс-100)	В комплексе лечения и профилактики инфекций гриппа и герпеса.
	Суперантитокс-50 (БАД)	Для предупреждения сезонной аллергии и бронхиальной астмы.
	Бетулаktiv (БАД) (Суперантитокс-50)	Для адаптации организма и улучшения состояния в дальних поездках.
	Бетулахит (БАД) (Суперантитокс-50)	Рост мышечной массы. Высокая выносливость. Сжигание жира.
	Бетулакервс (БАД) (Суперантитокс-25)	В программах снижения веса, поддержания красоты и здоровья.
	Бетулагепат (БАД)	Восстановление печени. В комплексе лечения гепатита С.
	Бетусил (БАД)	Для здорового функционирования ЖКТ и печени.
	Тубелон (БАД)	В комплексе лечения туберкулеза. Профилактика бронхита.
	Бетулайн (БАД)	Профилактика синдрома хронической усталости и депрессии.
	Бетуланорм (БАД)	Профилактика и лечение заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Таблица 1.2. Продолжение

<i>Название фирмы</i>	<i>Наименование продукта</i>	<i>Фарм. действие</i>
	Суперантитокс-100 (БАД)	Профилактика вторичных опухолей. Эффективен при радио и химиотерапии.
	007 (БАД) (Суперантитокс-25)	Очищение печени. Снятие алкогольной интоксикации и похмелья.
СНС-ФАРМА	Бетуал (БАД)	Уменьшает образование атеросклеротических бляшек. Снижает уровень холестерина.
	Бетулайф (Диетический коктейль)	Диетическая терапия.
	Алкошит (Домера) (БАД)	Смягчает течение алкогольного опьянения, защищает клетки печени и мозга.
ООО «Химико- биологи- ческое объединение» при РАН Фирма «Вита»	Бетулавитин (БАД)	Эффективное средство общеукрепляющего действия в условиях неблагоприятной экологической среды, урбанизации, не сбалансированного питания и стресса.
	Альбадент (Зубная паста)	Эффективное очищение. Стойкая защита от воспаления. Укрепление зубной эмали.
	МЭТР (Гель после бритья)	Защита от воспаления и длительное охлаждающее и освежающее действие.
	Маска омолаживающая и очищающая для лица, шеи и декольте	Стойкий и длительный эффект омоложения.
	"Формула преображения" (Крем для ног)	При утомлении и защита от воспалений.

Таблица 1.2. Продолжение

<i>Название фирмы</i>	<i>Наименование продукта</i>	<i>Фарм. действие</i>
	La femme élégante (Крем омолаживающий дневной)	Уникальное средство для ухода за кожей лица, шеи и декольте с антиоксидантными, иммуностимулирующими и противовоспалительными компонентами
	“Природный целитель” Крем для зрелой кожи с экстрактом бересты и мумиё	Профилактика появления возрастных пигментных пятен и сосудистых сеточек

Действие бетулоновой кислоты и эфиров бетулина – продуктов окисления и этерификации фитостерола бетулина, может быть усилено за счет образования межмолекулярных ассоциатов или комплексов с другими природными веществами – компонентов растительных масел, таких как β -ситостерол, каротиноиды, токоферолы, ненасыщенные кислоты. Так, известно, что β -каротин образует устойчивые комплексы включения с бетулином [96], а бетулин вступает в комплексообразование с токоферолами. Кроме того, показано, что одним из механизмов действия β -ситостерола является его действие по принципу антиметаболитов, благодаря подобию химической структуре холестерина, вытесняя его при взаимодействии с ЛПНП в плазме. Другим механизмом гипохолестеринемического действия является образование достаточно стабильных комплексов β -ситостерола с холестерином, затрудняя всасывание их из желудочно-кишечного тракта [64, 83, 101].

В связи с этим представляет интерес природное растительное сырье, содержащее в высокой концентрации ненасыщенные кислоты, фитостеролы, главным образом, β -ситостерол, и другие соединения циклопентанпергидрофенантренового ряда, проявляющие гиполипидемические свойства.

1.2. Масла как источники фитостеролов, обладающих гиполипидемическими свойствами

Масло семян тыквы *Cucurbita Pepo* (МСТ) является одним из источников биологически активных веществ, способных взаимодействовать с бетулоновой кислотой и эфирами бетулина. Его состав обогащен комплексом каротиноидов [5, 60, 70], токоферолов, ненасыщенных кислот и фитостеролов [38, 58, 73, 84].

Термин «фитостеролы» объединяет в себе несколько групп веществ, основными из которых являются стеролы и станолы растительного происхождения. Они являются компонентами растительных масел и существуют в свободной или конъюгированной форме. В МСТ содержатся свободные или связанные с белковыми веществами (сложные комплексы) фитостеролы, общее содержание которых колеблется от 0,03 до 1,0 % (1000 мг%). [65]

Все фитостеролы представляют собой 4-дез метильные стеролы и станолы, которые содержат гидроксильные группы в 3-ем положении. Таким образом, структура фитостеролов сходна с холестеролом. Однако, в боковой цепи молекулы имеются структурные различия между холестеролом и растительными фитостеролами: у растительных стеролов имеется дополнительно метильная группа (кампестерол), этильная группа (ситостерол) или двойная связь (стигмастерол). [64] Функции, которые выполняют холестерол и фитостеролы в растительных и животных клетках, аналогичны. Встраиваясь в клеточные мембраны, они обеспечивают их структурную целостность, однако, фитостеролы попадают в животный организм только с пищей, так как не могут быть синтезированы в нем.

К основным представителям фитостеролов масла семян тыквы относятся, главным образом, ситостеролы с одной двойной связью (α -, β -, γ -изомеры), браССИКАстерол ($C_{28}H_{46}O$) с двумя двойными связями и кампестерол ($C_{28}H_{48}O$) с одной двойной связью. [74] Основным ситостеролом тыквенного масла является β -ситостерол (Рисунок 1.1.)

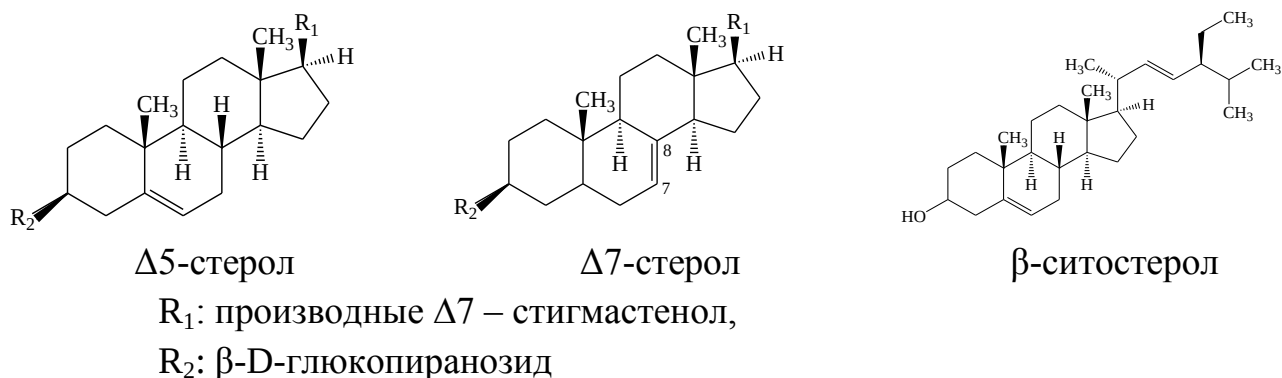


Рисунок 1.1. Формулы фитостанолов и фитостеролов, присутствующих в масле семян тыквы

В лекарственных препаратах и пищевых добавках в качестве основного источника фитостеролов используют не только овощные масла, но и талловое масло сосен, которое является побочным продуктом лесной и деревообрабатывающей промышленности. В технологии производства пищевых добавок стеролы и фитостеролы могут быть гидрированы до станолов (преимущественно ситостанолы). Ситостеролы и ситостанолы добавляют в различные пищевые продукты, такие как молоко, масло, маргарин и др. [105]

Высокое содержание ненасыщенных кислот (до 80 %) в сочетании с фитостеролами открывает широкие возможности для лечения липид-ассоциированных заболеваний [65], таких как атеросклероз (Таблица 1.3.). Благодаря подобию химических структур холестерина и β -ситостерола, последний вытесняет холестерол при взаимодействии с ЛПНП в плазме крови, действуя как антиметаболит, что обуславливает его гипохолестеринемическое действие. А также, образование стабильных комплексов β -ситостерола с холестерином затрудняет их всасывание из желудочно-кишечного тракта. [64, 83, 101]

Таблица 1.3.

Роль фитостеролов в комплексной терапии нарушений липидного обмена

Традиционные гиполипидеми- ческие ЛС	Комбинированная терапия с фитостеролами (2 г/сут) по US NCEP	
	Двойное комбинирование	Тройное комбинирование Действие / Эффективность
Фибраты: фенофибрат	-снижение триглицеридов; - увеличение ЛПВП; - увеличение уровня общего холестерола в плазме > 50%; - уменьшение ЛПНП	Снижение ЛПНП / ++ (статины, фитостеролы, фибраты)
Статины: аторвастатин	- снижение ЛПНП на 10%; - сокращение дозы статина в 2 раза; - снижение токсических эффектов	Снижение ЛПНП / +++ (статины (39%), фитостеролы (13%), холестирамин (15%))
Омега 3 – жирные кислоты: α -линоленовая кислота (18:3 _{n-3})	- снижение уровня ЛПНП; - снижение концентрации триглицеридов в сыворотке крови; - снижение количества маркеров воспаления в сыворотке крови	Снижение ЛПНП / ++ (статины, фитостеролы, омега 3 – жирные кислоты)
Никотиновая кислота (Ниацин)	незначительное снижение уровня ЛПНП по сравнению с ниацином	Снижение ЛПНП / + (статины, фитостеролы, ниацин)
Холестирамин	синергизм действия отсутствует	Снижение ЛПНП / +++ (статины (39%), фитостеролы (13%), холестирамин (15%))
Эзетимиб	незначительное снижение уровня ЛПНП по сравнению с эзетимибом	Снижение ЛПНП / ++ (статины, фитостеролы, холестирамин)

1.3. Бетулин и его производные как потенциальные лекарственные вещества

Производные бетулина обладают широким спектром фармакологического действия, к которым можно отнести противовоспалительное, гиполипидемическое, антиоксидантное, гепатопротекторное и другие [3, 71]. По своей структуре бетулин и его производные напоминают стероидные вещества [42], однако, сохраняя комплекс ценных фармакологических свойств, они лишены ряда побочных действий. В системе желудочно-кишечного тракта функции бетулоновой кислоты и эфиров бетулина близки к действию желчных кислот, механизм которых включает коллоидно-химические эффекты, в том числе мицеллирование, диспергирование, образование комплексов с липидами.

1.3.1. Биологическая активность производных бетулина

В литературе основное внимание уделяется противоопухолевому и противовирусному действию производных бетулина. [36, 47, 75, 94]

Доказано, что соединения лупанового ряда обладают противоопухолевой активностью, причем наиболее сильное действие оказывает бетулиновая кислота, которая признана эффективным ингибитором роста раковых клеток [47, 85].

Бетулин, бетулиновая и бетулоновая кислоты интересны для медицины как основы для разработки новых противовирусных лекарственных средств, проявляющих ингибирующее действие, например, в отношении вируса простого герпеса типа I и вируса гриппа типа A, которые сочетают также иммуностимулирующее действие. Известно, что аллобетулин оказывает умеренно-выраженное действие в отношении вируса гриппа типа B. [50, 52, 61]

Также, много исследований проведено по доказательству гепатопротекторных свойств бетулина и его производных. Показано, что в эксперименте на культуре раковых клеток печени человека бетулин практически полностью подавляет цитотоксическое действие CdCl_2 в концентрации менее 0.1

мкг/мл ($2 \cdot 10^{-7} \text{M}$). Гепатопротекторная активность бетулина обусловлено его воздействием на внутриклеточные мишени. [68]

Данные, опубликованные индийскими исследователями в 2000 году, представляют особый интерес. Они экспериментально доказали эффективность бетулина и лупеола в предотвращении образования камней в мочевом пузыре крыс. Механизм действия обоих исследованных тритерпеноида заключается в подавлении образования оксалатных камней и повреждения защитной антиокислительной системы, чем они минимизируют кристалл-индуцирующие перекисные изменения. [43]

Как и описанные ранее бетулин и его производные, диацетат бетулина также обладает противоопухолевой и противовирусной активностью. [37, 94] Доказано, что моно- и диацетат, дисукцинат бетулина проявляют гипополипидемические и желчегонные свойства, а также обладают гепатопротекторной активностью. [3, 45, 47, 51] Причем достоверно известно, что фармакологическая активность эфиров бетулина в несколько раз выше активности своего предшественника. Антиоксидантные свойства диацетата бетулина объясняются его влиянием на количество малонового диальдегида, на активность каталазы и супероксиддисмутазы в печени и эритроцитах, что было доказано в эксперименте на крысах. [12] Авторы полагают, что диацетат бетулина выступает в роли ловушки активных форм кислорода, стимулирует синтез или влияет на активность антиоксидантных ферментов.

Таким образом, следует отметить, что наряду с данными по противоопухолевой и противовирусной активности бетулина и его производных, исследования гипополипидемического и гепатопротекторного действия представлены в литературе очень скудно. Однако, в связи с проблемой роста липид-ассоциированных заболеваний в последние годы, изучение таких свойств фармацевтических субстанций представляет большой интерес.

1.3.2. Синтетические подходы к препаративным методикам получения производных бетулина с предполагаемым гипополидемическим действием

В настоящее время большое количество работ посвящено получению различных производных природного компонента бересты березы - бетулина. [8, 9, 10, 13, 16, 24, 26, 27, 39, 47, 48, 88] Основное внимание в обзоре уделено методикам получения производных бетулина.

1) Синтез продуктов окисления бетулина

В литературе, посвященной получению бетулоновой кислоты, проявляющей потенциальное гипополидемическое действие, описаны методики окисления бетулина реактивом Джонса в ацетоне со сложным последующим процессом выделения целевого продукта. [10, 35, 69, 89] Также описаны методики окисления бетулина пиридиндихроматным комплексом с уксусным ангидридом в диметилформамиде [33] и оксидом хрома (VI) в уксусной кислоте. [34, 55] Общий механизм реакции окисления бетулина до бетулоновой кислоты представлен на схеме 1.1.

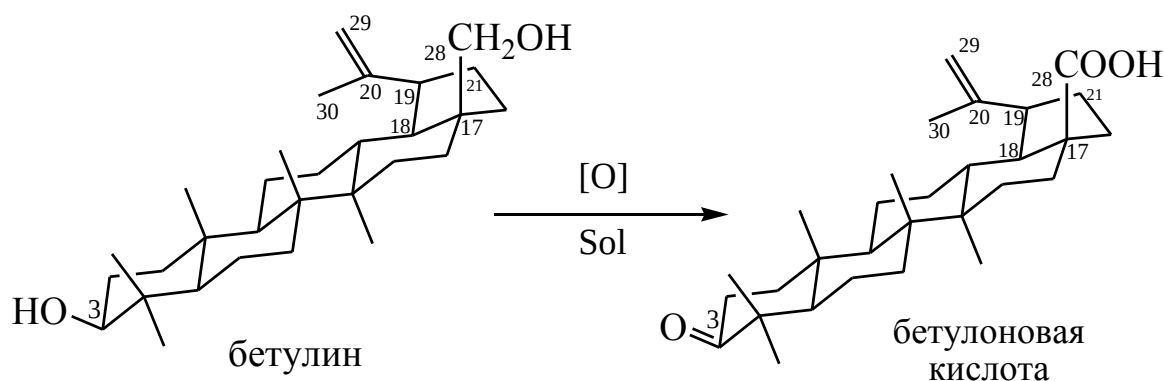


Схема 1.1. Окисление бетулина до бетулоновой кислоты.

Основными примесями в этой реакции являются бетулиновый и бетулоновый альдегиды и аллобетулин, также проявляющие гипополидемическое и гипохолестеринемическое действие.

В литературе описано несколько способов синтеза аллобетулина. Один из способов получения аллобетулина заключается в нагревании бетулина в диоксане,

бутаноле, изобутаноле, ксилоле или октане с ортофосфорной кислотой. [26] В работах [15, 16] в качестве растворителя предложено использовать бутанол, изобутанол, толуол или п-ксилол и вести синтез при кипячении в присутствии ортофосфорной или 70% серной кислоты. Также аллобетулин можно получить реакцией с гексагидратом хлорида окисного железа ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) в хлороформе [28], реакцией изомеризации на твердой подложке (SiO_2) в присутствии серной кислоты [77], и проведением гетерогенного катализа при температуре кипения дихлорметанового раствора бетулина с хлоридом или нитратом железа (III), адсорбированными на оксиде алюминия или силикагеле [76]. (Схема 1.2)

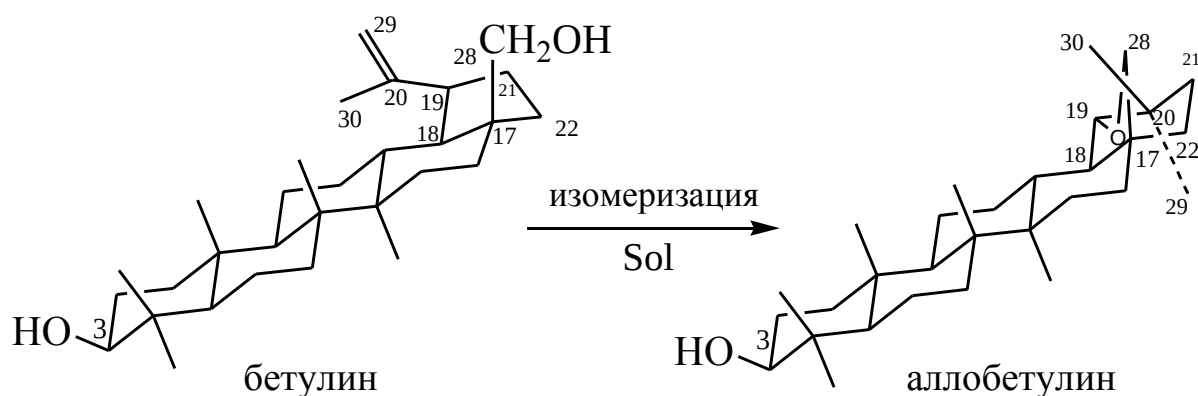


Схема 1.2. Реакция синтеза аллобетулина.

Получить бетулиновый альдегид можно окислением бетулина дихроматом калия на силикагеле в среде дихлорметана [97], а бетулоновый альдегид – хлорхроматом или дихроматом пиридиния также в среде дихлорметана. [49, 74] (Схема 1.3) Синтез бетулиновой кислоты основан на восстановлении бетулоновой кислоты боргидридом натрия. (Схема 1.4)

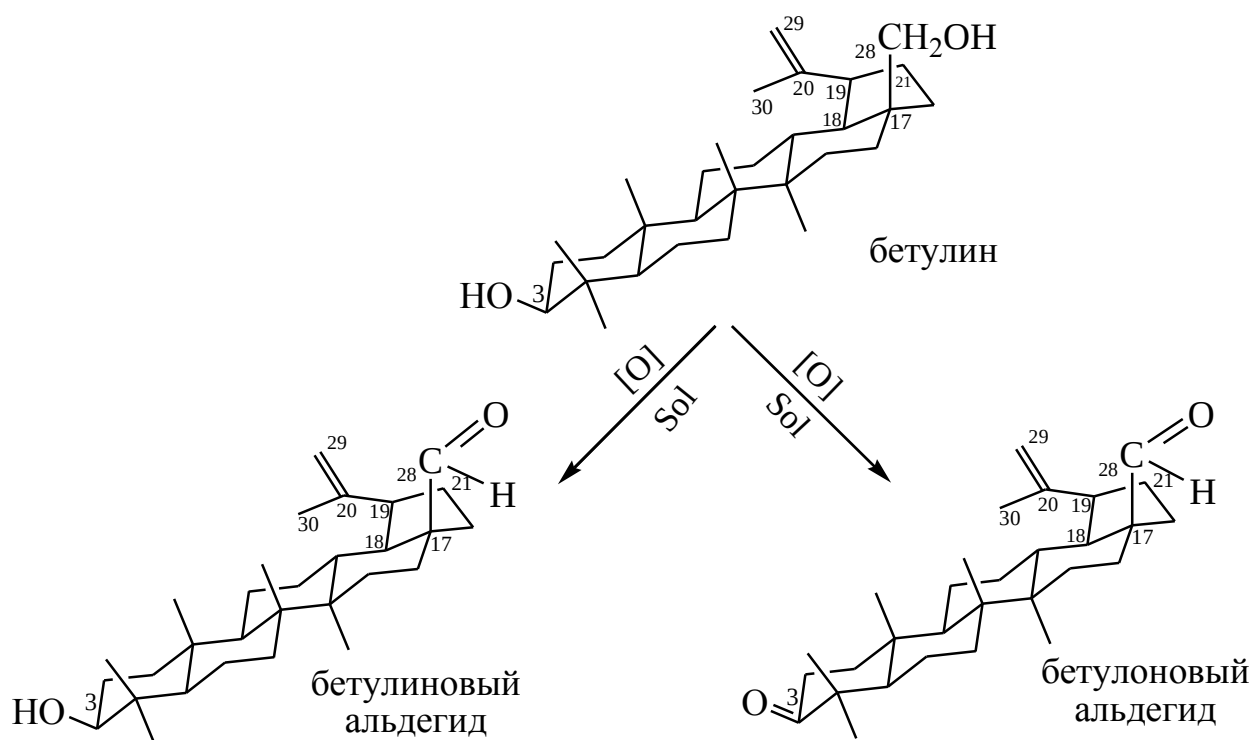


Схема 1.3. Реакция окисления бетулина до бетулинового и бетулонового альдегидов.

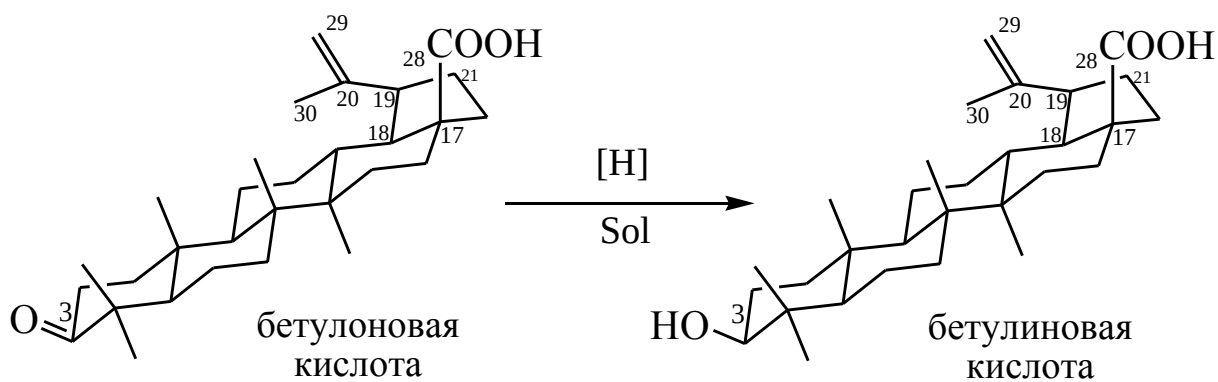


Схема 1.4. Восстановление бетулоновой кислоты до бетулиновой.

Эпоксид бетулина предлагается получать реакцией взаимодействия бетулина с ацетоновым раствором диметилдиоксирана в смеси дихлорметана и ацетона (1:1) при перемешивании в течение часа. [59] (Схема 1.5)

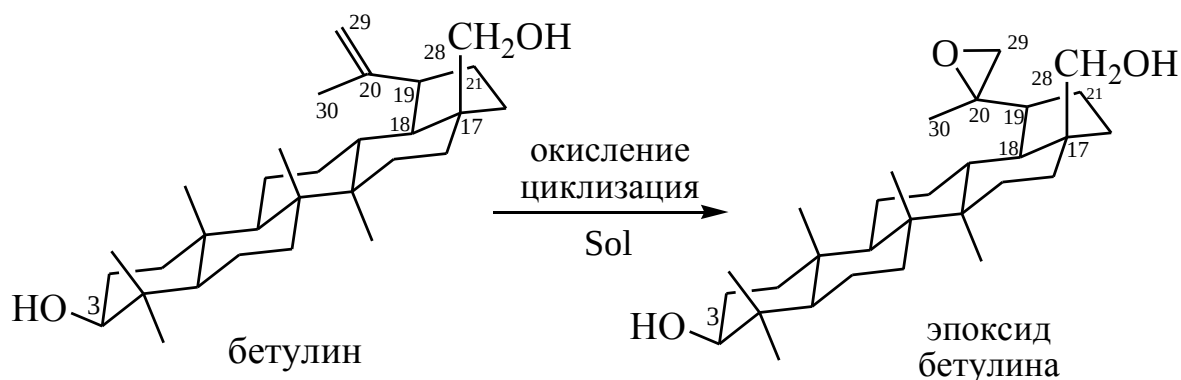


Схема 1.5. Реакция получения эпоксид бетулина.

2) Синтез эфиров бетулина

Так как одним из наиболее перспективных направлений является использование эфиров бетулина, то их синтезу уделяется большое внимание.

Получение эфиров фосфорной кислоты

Синтез фосфатов спиртов этерификацией первичной, вторичной или третичной спиртовой группы с использованием обычных фосфатирующих реагентов (фосфорная кислота, P_2O_5 , трихлороксид фосфора и др.) представляет собой сложную задачу. В случае простых алифатических спиртов получение эфиров при взаимодействии с хлорангидридами фосфора предполагается образование триэфира фосфорной кислоты. (Схема 1.6)

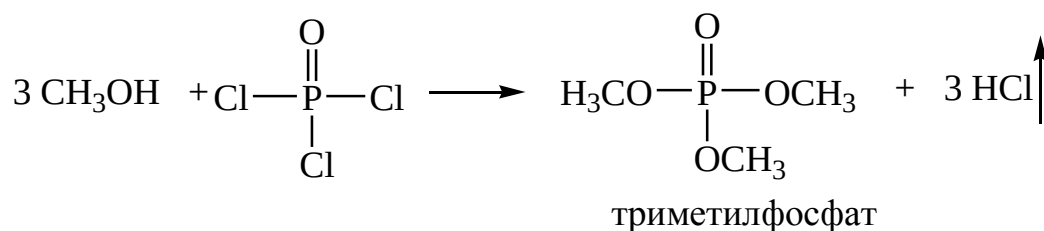


Схема 1.6. Образование триэфира фосфорной кислоты на примере взаимодействия с метанолом.

Наиболее детально и подробно этот процесс изучен для получения 1,2- и 1,3-дизамещенных диглицерофосфатидовых кислот. [17, 54] Описанные в литературе способы синтеза фосфатидовых кислот являются не универсальными и имеют множество недостатков: многостадийность, трудоемкость, образование

большого количества побочных продуктов (пирофосфатов). Известная схема синтеза заключается в фосфорелировании 1,2-дизамещенных глицеридов (ДГ) хлороксидом фосфора в присутствии акцептора образующегося хлористого водорода и избытка POCl_3 – амина (триэтиламин, пиридин), с последующим гидролизом промежуточных продуктов – фосфодихлоридов, водой. Доказано, что в хлороформе при низких температурах диалкил(алкилацил)глицерофосфодихлориды являются устойчивыми соединениями. Однако, в присутствии оснований, таких как пиридин, продуктами реакции являются соли фосфатидовых кислот и пирофосфаты, которые превращаются в фосфатидовые кислоты под действием водного диметилсульфоксида (ДМСО). Такая методика позволяет получать целевой продукт с выходом, достигающим 80 %. [17, 54] Структура продуктов доказана ЯМР-спектроскопией.

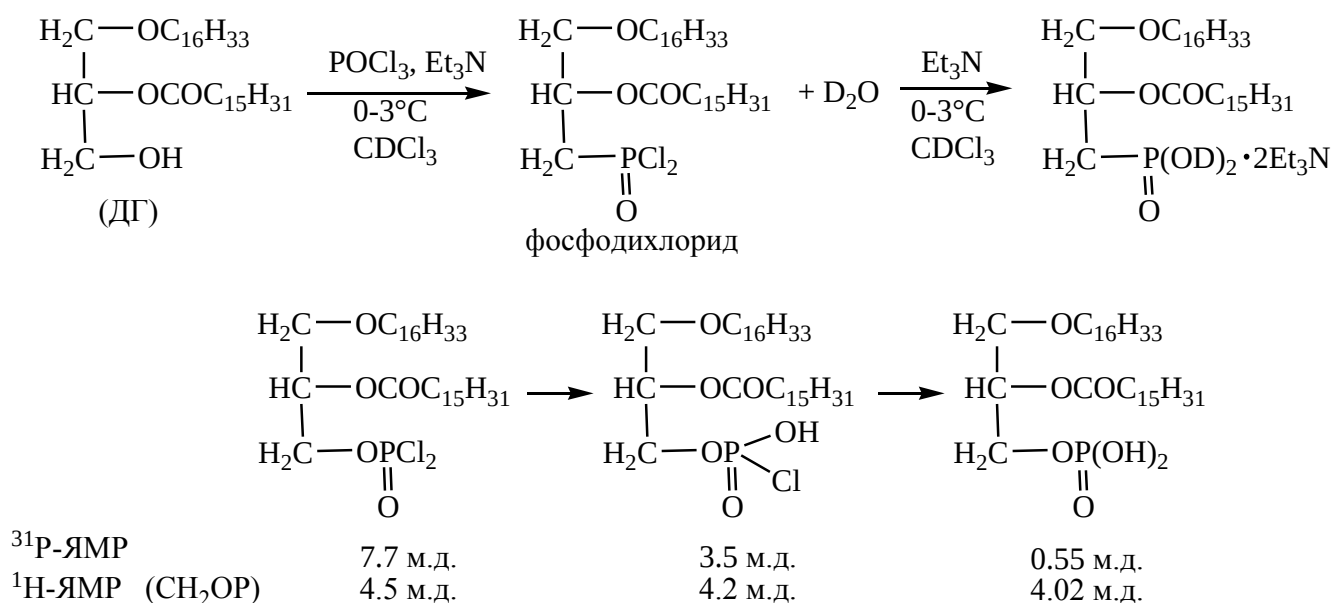


Схема 1.7. Механизм реакции фосфорелирования 1,2-дизамещенных глицеридов.

Для тритерпеноидов наиболее близкими структурами по строению являются стероидные лекарственные вещества. Таким образом, можно сделать предположение, что синтез эфиров фосфорной кислоты и бетулина будет проходить аналогично получению фосфатов стероидов.

Существует много методик синтеза фосфатов стероидных соединений, однако, все они базируются на общих правилах: на раствор субстрата в органическом растворителе (тетрагидрофуран, ацетонитрил, диметилсульфоксид, метанол и т.д.) действуют фосфорелирующим реагентом (пирофосфорилхлорид, POCl_3 , фосфорная кислота и т.д.). При этом чаще всего в реакционную смесь добавляют акцептор HCl , наиболее эффективными из которых являются пиридин и триэтиламин. В зависимости от выбранного растворителя реакцию ведут при комнатной, пониженной температуре или температуре кипения. Время реакции также варьирует от нескольких минут до часов, и даже суток. (Таблица 1.4)

В литературе практически отсутствуют данные по синтезу фосфатов бетулина. Известная методика получения 3,28-дифосфата бетулина заключается в реакции фосфорелирования бетулина хлорокисью фосфора и трихлоридом фосфора, продувая реакционную смесь аргоном. Реакция идет в течение более четырех суток при нагревании до 90-95°C. Процесс выделения целевого продукта очень трудоемкий и включает в себя отгонку токсичной хлорокиси фосфора под вакуумом, кристаллизацию при отрицательных температурах из гексана, перекристаллизацию из гептана, повторную кристаллизацию с дальнейшим растворением в воде и сушкой над P_2O_5 и KOH . При этом выход дифосфата бетулина достигает всего 68-75 %. [25]

Гидролизовать промежуточный продукт бетулин-3,28-дифосфохлорид можно кипячением в течение 18 ч в смеси диоксан – вода (50 : 1), а при нейтрализации непрореагировавших реагентов водным раствором бикарбоната натрия можно получить натриевые соли фосфата бетулина. [59]

Таким образом, можно достоверно утверждать, что препаративные методики получения фосфатов бетулина отсутствуют, что затрудняет его использование в качестве фармацевтической субстанции, несмотря на потенциально высокую фармакологическую активность.

Таблица 1.4.

Примеры синтеза и обработки фосфатов стероидных лекарственных веществ

Источник	Субстрат	Реакция			t, °C	τ, ч	Выделение целевого продукта		Продукт
		Реагент	Sol	Акцептор HCl					
[90]	Бетаметазон 17-изобутират	Пиро-фосфорил-хлорид $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{Cl}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{Cl} \\ \quad \\ \text{Cl} \quad \text{Cl} \end{array}$	Сухой ТГФ*		0 - 5	3	1. добавление ледяной воды 2. упаривание ТГФ под вакуумом 3. экстракция этилацетатом, промывка водой, упаривание 4. растворение в смеси метанол – вода + раствор NaOH до pH 9,0 5. промывка этилацетатом + раствор HCl 6. экстракция этилацетатом 7. упаривание растворителя в вакууме 8. кристаллизация из водного метанола		Бетаметазон 17-изобутират 21-дигидро-фосфат
	Бетаметазона 17-валерат	POCl ₃	Сухой ТГФ*	Пиридин	0 – комн.	24	1-7. Аналогично 8. кристаллизация из ацетона		Бетаметазон 17-валерат 21-дигидро-фосфат
	Преднизолон 17-пропионат	POCl ₃	ТГФ*	Пиридин	0 - комн.	6,5	1-6. Аналогично	7. обработка эфирным диазометаном. 8. очистка ТСХ 9. кристаллизация из ацетона и петролейного эфира	Преднизолон 17 пропионат 21- диметил-фосфат
								7. растворение в смеси метанол – вода + раствор NaOH до pH 9,0 8. разбавление большим количеством воды, сушка вымораживанием	Преднизолон 17-пропионат 21-динатрий-фосфат

Таблица 1.4. Продолжение

Источник	Субстрат	Реакция			t, °C	τ, ч	Выделение целевого продукта	Продукт
		Реагент	Sol	Акцептор HCl				
[91]	Гидрокортизон	90% H ₃ PO ₄	Чистый ацетонитрил	Триэтил-амин	Кип.	4	1. удаление растворителя в вакууме 2. растворение в смеси этанол - вода 3. колоночная хроматография Zeo- Karb 225 (H ⁺ форма) (элюент – этанол разной концентрации) 4. элюат + раствор NaOH до pH 7,0 5. удаление растворителя, кипячение с метанолом 20 минут 6. фильтрование, промывка метанолом 7. фильтрование, упаривание досуха в вакууме 8. растворение в воде, добавление ацетона 9. промывка ацетоном, сушка при 100°C	Гидро-кортизона-21-фосфат натрия
	Преднизолон	90% H ₃ PO ₄	Чистый ацетонитрил	Триэтил-амин	Кип.	4	1-9. Аналогично	Натриевые соли преднизолона 21- фосфата
	Гидрокортизон	H ₃ PO ₄	Ацетонитрил/ ДМСО/ диметил-ацетамид	основание	Кип.	4	1. удаление растворителя в вакууме 2. растворение в смеси этанол - вода 3. бумажная хроматография Whatman No.54 (элюент: изопропанол-аммиак-вода) 4. элюат + раствор NaOH до pH 7,0 5. удаление растворителя, кипячение с метанолом 20 минут 6. фильтрование, промывка метанолом 7. фильтрование, упаривание досуха в вакууме 8. растворение в воде, добавление ацетона 9. Промывка ацетоном, сушка при 100°C	Гидро-кортизон-21-фосфат

Таблица 1.4. Продолжение

Источник	Субстрат	Реакция			t, °C	τ, ч	Выделение целевого продукта	Продукт
		Реагент	Sol	Акцептор HCl				
[91]	Гидрокортизон	90% H ₃ PO ₄	Ацетонитрил/ ДМСО/ диметил-ацетамид	Триэтил-амин	Нагревание	4	1-9. Аналогично	Гидро-кортизон-21-фосфат
	21-бromo-3β,17α-дигидрокси-5α-прегнан-11,20-дион	90% H ₃ PO ₄	Ацетонитрил	Триэтил-амин	Кип.	8	1. охлаждение, фильтрация, промывка ацетонитрилом 2. растворение в смеси вода:спирт (1:1) 3. колоночная хроматография Zeo- Karb 225 (H ⁺ форма) (элюент – этанол разной концентрации) 4. элюат + раствор NaOH 5. удаление растворителя под вакуумом 6. экстракция кипящим метанолом, упаривание досуха 7. осаждение ацетоном из воды 8. перекристаллизация из воды и ацетона	3β,17α,21-тригидрокси-5α-прегнан-11,20-дион 21-фосфат динатриевая соль
	Преднизолон	H ₃ PO ₄	Ацетонитрил	Триэтил-амин	Кип.	2,5 - 3	1. упаривание растворителя в вакууме 2. растворение в метаноле + раствор NaOH до pH 10,9 3. фильтрация, упаривание в вакууме 4. растворение в метаноле, фильтрация 5. растворение в ацетоне, фильтрация, сушка при 100 °C	Преднизолон фосфат динатриевая соль

Таблица 1.4. Продолжение

Источник	Субстрат	Реакция			t, °C	τ, ч	Выделение целевого продукта	Продукт
		Реагент	Sol	Акцептор HCl				
[91]	Преднизолон	H ₃ PO ₄	Ацетонитрил	Триэтил-амин	Кип.	2,5 - 3	преднизолон 21-фосфат динатриевая соль 1. растворение в воде + раствор HCl 2. экстракция этилацетатом, промывка водой 3. сушка органического слоя над MgSO ₄ 4. фильтрация MgSO ₄ , промывка ацетоном 5. выпаривание фильтрата досуха в вакууме	Преднизолон 21-дигидро-фосфат
	Преднизолон	90% H ₃ PO ₄	Метанол	Триэтил-амин	90-100	2	1. охлаждение + раствор NaOH 2. фильтрация, промывка смесью метанол - вода 9:1 3. упаривание в вакууме 4. разбавление водой + раствор NaOH до pH 8,6 5. + ацетон, удаление растворителя в вакууме 6. + ацетон, фильтрование, сушка	Преднизон 21-фосфат динатриевая соль
[92]	6α-фтор-триамцетонид-ацетонид	POCl ₃	Пиридин	Пиридин	-23 – -10	3 мин	1. удаление пиридина под вакуумом 2. растворение в хлороформе, экстракция водой 3. нейтрализация K ₂ CO ₃ до pH 7,0, лиофилизация 4. растворение в метаноле, центрифугирование, концентрирование в вакууме 5. повтор пункта 4 до полного растворения вещества в метаноле 6. кристаллизация из эфира	Дикалиевая соль 6α-фтортриамцетонид-ацетонида фосфата

Таблица 1.4. Продолжение

Источник	Субстрат	Реакция			t, °C	τ, ч	Выделение целевого продукта	Продукт
		Реагент	Sol	Акцептор HCl				
[93]	Гидрокортизон	Диморфо- лидо- фосфорил- хлорид	Хлороформ	Пиридин	Комн.	5 сут.	1. добавление воды 2. промывка хлороформного слоя водой, раствором HCl, водой 3. сушка, отгонка растворителя в вакууме 4. перекристаллизация из этанола.	Гидро- кортизон-21- диморфолидо -ортофосфат
							Гидрокортизон-21-диморфолидо-ортофосфат 1. растворение в этаноле, добавление воды 2. колоночная хроматография через колонку с ионообменником, содержащим группу сульфоновой кислоты 3. нейтрализация элюата раствором NaOH до pH 6,7 4. выпаривание под вакуумом при 35°C 5. растворение в воде, экстракция этилацетатом 6. сушка водной фазы выпариванием в вакууме при 35°C 7. растворение в метаноле, экстракция эфиром 8. фильтрация, промывка эфиром, сушка при 100 °C	Гидро- кортизона-21- ортофосфат
[87]	Преднизолон	Пиро- фосфорил- хлорид $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{Cl}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{Cl} \\ \quad \\ \text{Cl} \quad \text{Cl} \end{array}$	ТГФ*	-	-50 – -10	2,5	1. добавление ледяной воды 2. удаление ТГФ в вакууме 3. обработка слабощелочной анионообменной смолой 4. сушка вымораживанием, промывка ацетоном, экстракция метанолом 5. концентрирование	Натриевая соль преднизолона -21-фосфата

Таблица 1.4. Продолжение

Источник	Субстрат	Реакция			t, °C	τ, ч	Выделение целевого продукта	Продукт
		Реагент	Sol	Акцептор HCl				
[87]	Преднизолон	Пиро-фосфорил-хлорид $\begin{array}{c} \text{O} & \text{O} \\ \parallel & \parallel \\ \text{Cl}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{Cl} \\ & \\ \text{Cl} & \text{Cl} \end{array}$	ТГФ*	Пиридин	-50 – -10	2,5	1. добавление водного раствора NaHCO ₃ , перегонка в ТГФ в вакууме 2. фильтрация, растворение в метаноле 3. выпаривание метанола, сушка вымораживанием, очистка смесью метанол-ацетон	Натриевая соль преднизолона-21-фосфата
	Дексаметазон	Пиро-фосфорил-хлорид $\begin{array}{c} \text{O} & \text{O} \\ \parallel & \parallel \\ \text{Cl}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{Cl} \\ & \\ \text{Cl} & \text{Cl} \end{array}$	ТГФ*	-	-40	2	1. добавление воды 2. удаление ТГФ в вакууме с активированным углем 3. фильтрация акт. угля, промывка водой, добавление метанола и метанольного раствора NaOH до pH 8,0 4. фильтрация, промывка угля метанолом 5. концентрирование метанольного раствора в вакууме, перекристаллизация из смеси метанол - ацетон	Натриевая соль дексаметазона-21-фосфата

Примечание. * ТГФ – тетрагидрофуран.

Синтез ацетатов бетулина

Диацетат бетулина получают реакцией этерификации бетулина непосредственно из бересты березы уксусной кислотой при температуре кипения [29, 53], а также очищенного бетулина в среде фосфорной кислоты [24] или этилацетата в присутствии пара-толуолсульфокислоты [23]. Известен способ получения диацетата бетулина кипячением с уксусным ангидридом. [46] (Схема 1.8)

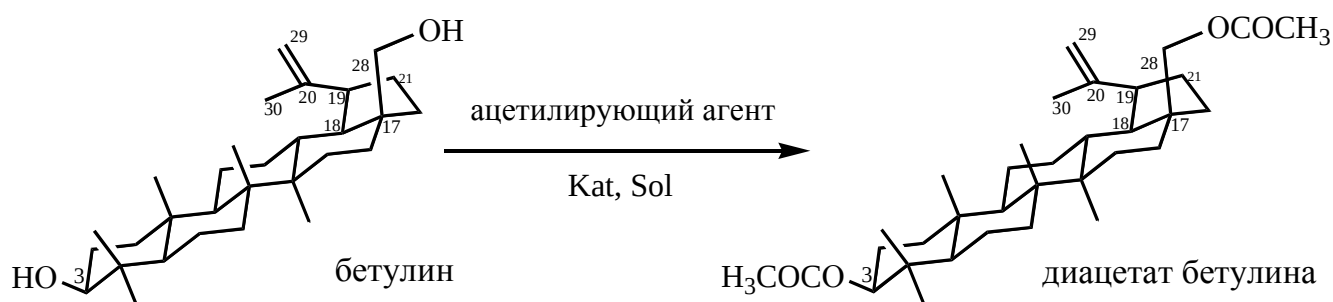


Схема 1.8. Общая схема получения диацетата бетулина.

Получение моноацетата бетулина является более трудоемким процессом. Однако описана методика его получения с относительно высоким выходом (85%) селективным ацетилированием первичной гидроксильной группы бетулина уксусным ангидридом в присутствии имидазола. [75] Синтез моноацетата бетулина обработкой уксусным ангидридом в присутствии диметилформамида и пиридина в среде дихлорметана дает выход целевого продукта всего 45 %. [94] (Схема 1.9)

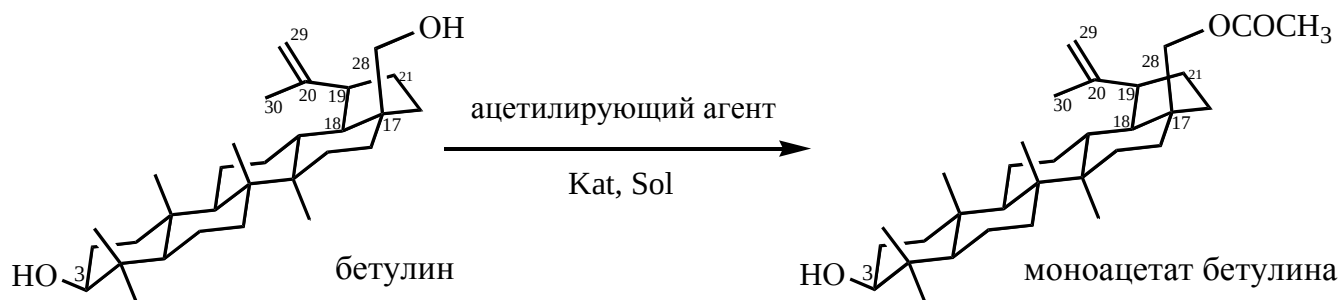


Схема 1.9. Общая схема получения моноацетата бетулина.

Моноацетат бетулина является побочным продуктом в синтезе диацетата, однако, она обладает аналогичной фармакологической активностью и практически не уступает ему по эффективности, что позволяет использовать в качестве фармацевтической субстанции смесь этих веществ.

Синтез сукцинатов бетулина

Сложный эфир бетулина и янтарной кислоты получают этерификацией бетулина янтарным ангидридом в различных растворителях: пиридин [51], N-метилпирролидон [86], метилтретбутиловый эфир [30] или дихлорметан [88]. Катализатором и структурирующим реакционную смесь агентом выступает имидазол. При этом образуется смесь моно- и дизамещенных эфиров, соотношение которых можно регулировать изменением количества янтарного ангидрида, времени и температуры протекания реакции. (Схема 1.10)

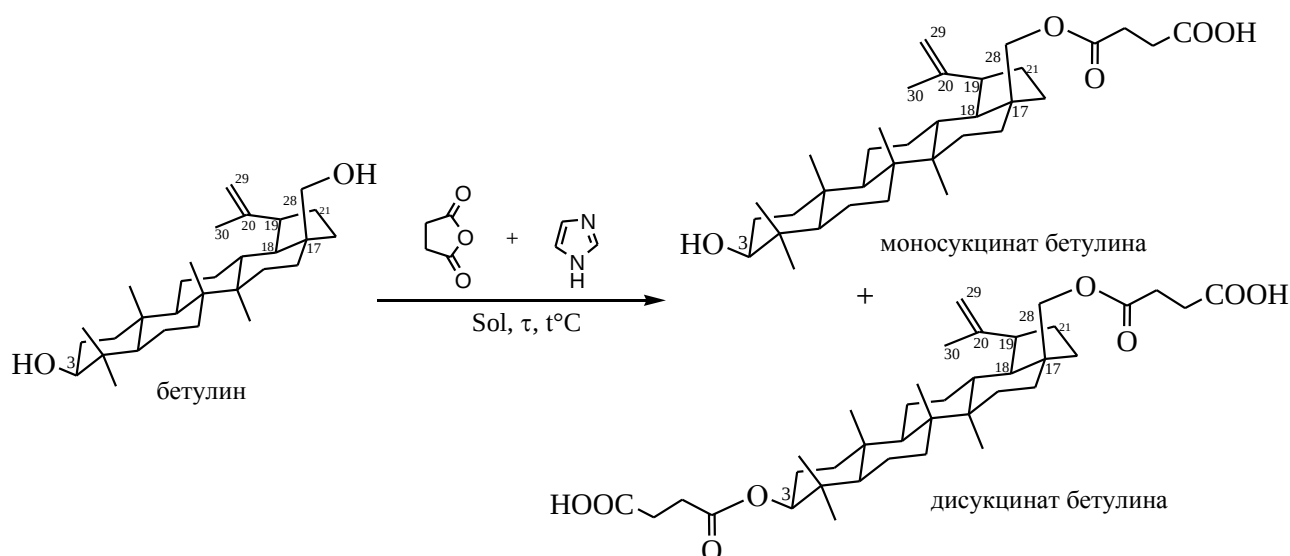


Схема 1.10. Общая схема получения сукцинатов бетулина

Выводы по главе 1:

1. На фармацевтическом рынке ощущается недостаток гиполипидемических ЛС (менее 50 наименований), получаемых из природного растительного сырья. Из препаратов такого рода основным представителем является урсодезоксихолевая кислота и минеральные масла, содержащие ненасыщенные жирные кислоты и фитостеролы.

2. Несмотря на обширные исследования в области поиска оптимального синтеза производных бетулина, в том числе наиболее перспективной бетулоновой кислоты и эфиров бетулина, препаративные методики синтеза таких потенциальных ЛВ практически отсутствуют.

3. Циклопентанпергидрофенантроновые соединения – β -ситостерол и другие фитостеролы, урсодезоксихолевая кислота и ее производные, эфиры бетулина, проявляют гиполипидемическое действие.

4. Компоненты растительных масел являются источником соединений, проявляющих гиполипидемическое действие (фитостеролы, каротиноиды), и могут выступать в качестве вектора доставки тритерпеноидов.

Таким образом, перспективным является создание фитопрепаратов тритерпеноидов лупанового ряда – производных бетулина, в масле семян тыквы, которое является источником компонентов гиполипидемического действия и способно выполнить роль вектора доставки.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты, материалы и методы исследования

Бетулин ($C_{30}H_{50}O_2$), чистота 99.5 % (ВЭЖХ), бетулоновый альдегид ($C_{30}H_{46}O_2$) получены по методикам [32, 74] и использовались как образцы сравнения для ВЭЖХ.

Гетерополиокислоты: *фосфорно – вольфрамовая кислота* ($(H_3PW_{12}O_{40})$, ХЧ, ТУ 6-09-3576-78); *фосфорно – молибденовая кислота* ($(H_7PMo_{12}O_{42})$, ХЧ, ТУ 6-09-3540-78); *молибдо – кремневая кислота* ($(H_4SiMo_{12}O_{40})$, ХЧ, ТУ 6-09-01-744-88).

Янтарный ангидрид ($C_4H_4O_3$, Ч, ТУ 6-09-3611-85, ЗАО «ВЕКТОН»), *кислота уксусная* ($C_2H_4O_2$, ХЧ, ГОСТ 81-75 изм. №3, «НеваРеактив»), *имидазол* ($C_3H_4N_2$, ИМП, ТУ 6-09-37-1127-91, ЗАО «ВЕКТОН»), *кислота хлористоводородная концентрированная* (HCl, Ч, ГОСТ 3118-77, АО «Реахим»), *кислота ортофосфорная 85%* (H_3PO_4 , Ч, ГОСТ 6552-80, ЗАО «ХИМПРЕАКТИВ»), *кислота серная концентрированная* (H_2SO_4 , ХЧ, ГОСТ 4204-77, ООО «Сигма-Тек»), *дихлорметан* (CH_2Cl_2 , ХЧ, ТУ 2631-019-44493179-98, ЗАО «ВЕКТОН»), *натрия гидроксид* (NaOH, ЧДА, ГОСТ 4328-77, изм. №1,2, ЗАО «НПО ЭКРОС»), *изопропанол* (C_3H_8O , ХЧ, ГОСТ 9805-84, ЗАО «ЭКОС-1»), *этанол 95%* (C_2H_6O , ГОСТ 51652-2000), *ацетон* (C_3H_6O , ЧДА, ГОСТ 2603-79, ЗАО «База №1 Химреактивов»), *ацетонитрил* (C_2H_3N , ТУ 2636-040-44493179-00, НПК «КРИОХРОМ»), *этилацетат* ($C_4H_8O_2$, ХЧ, ГОСТ 22300-76, ЗАО «ЭКОС-1»), *1,4-диоксан* ($C_4H_8O_2$, ИМП, ГОСТ 10455-80, ОАО «Реактив»), *пиридин* (C_5H_5N , ЧДА, ГОСТ 13647-78, АО «Реахим»), *пара-толуолсульфокислота (p-TCK)* ($C_7H_8SO_3$, ТУ 6-09-3668-77), *натрий сернокислый безводный* (Na_2SO_4 , Ч, ГОСТ 4166-76, АО «Реахим»), *калий двуххромовокислый* ($K_2Cr_2O_7$, Ч, ГОСТ 4220-75, АО «Реахим»), *масло семян тыквы* (ТУ 42-8110-06, ЗАО НПО «Европа-Биофарм»), *тимол* ($C_{10}H_{14}O$, Ч, ТУ 6-09-37-36-79, ЗАО «ВЕКТОН»), *силикагель* (SiO_2 , КСКГ, ГОСТ 3958-78, ООО «ВЕКОС»), *активный оксид алюминия* (Al_2O_3 , АОА – ш, марка А,

ТУ 2163-015-44912618-2003, ЗАО «Химреактив»), вода деионизованная (ФС 42-0324-09), полученная на установке системы очистки воды «Elix 3» с картриджем Progard («Millipore», France), удельное сопротивление менее 0,2 $\mu\text{См}$ с pH 5.5 при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$ использовались без предварительной очистки и какой-либо обработки.

Методы исследования и приборы:

ИК-спектры снимали на инфракрасном спектрофотометре с преобразователем Фурье «IR Prestige-21» (Shimadzu, Japan) в области 4000-400 см^{-1} в виде смесей с KBr.

Хроматограммы получали на высокоэффективном жидкостном хроматографе «LC-20A μ r» (Shimadzu, Japan) в обращено-фазовом режиме с дегазатором подвижной фазы, термостатом колонки и диодно-матричным УФ-детектированием ($\lambda = 196$ и 210 нм), колонка Discovery C18 (25 см x 4.6 mm, 5 μm , Supelco), температура колонки $40 \pm 1^\circ\text{C}$. Подвижная фаза: ацетонитрил – деионизованная вода (90 : 10, об.%), скорость потока – 1,0 мл/мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Время регистрации хроматограммы 40 мин.

^{13}C и ^1H ЯМР спектры регистрировали на ЯМР-спектрометре «Agilent DD2 400» (Agilent Technologies, USA) в DMSO-d₆, CDCl₃ и D₂O на рабочей частоте 101 и 400 МГц соответственно.

^{31}P -ЯМР спектры регистрировали на импульсном ЯМР-спектрометре «Bruker AM500» (Bruker Daltonik GmbH, Germany) в DMSO-d₆, CDCl₃ и D₂O на рабочей частоте 202,46 МГц

Электронные спектры поглощения получали на УФ-спектрофотометре «Specord S – 100» (Analytik Jena, Германия) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Масс-спектры получали ионизацией электронным ударом (70 эВ) на хромато – масс – спектрометре GCD Plus (Hewlett Packard, USA) с квадрупольным масс-спектрометром в качестве детектора, с газовым хроматографом. Капиллярная колонка модели Agilent 19091S – 433 HP – 5MS длиной 30 м и

внутренним диаметром 0.25 мм, жидкая фаза – 5 % дифенил – и 95 % полидиметилсилоксан; газ – носитель: гелий; скорость потока 1 мл/мин.

Атомно – абсорбционные спектры снимали на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA – 7000F (Shimadzu, Japan) с двухлучевой оптической схемой и автоматическим дозатором проб в пламенном режиме лампой с полым катодом.

Условия аналитической *ТСХ*: адсорбент – Merck GF254, , элюент – н-гексан – этилацетат – муравьиная кислота, 20 : 5 : 1. Проявляли в йодной камере.

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «Unico 1200» («United Products & Instruments, Inc», USA).

Лабораторные электронные аналитические весы «KERN 770-13» с $d = 0,0001$ г, Max 120 г и «KERN 440-33» с $d = 0,01$ г, Max 200 г. (KERN & Sohn GmbH, Germany); электронные аналитические весы «Shimadzu ATX-124» с $d = 0,0001$ г, Max 120 г (Shimadzu, Japan); электронные весы A&D ЕК-400Н с $d = 0,01$ г, Max 200 г (USA).

Центрифуга «СМ-6 (RPM×1000)» (ELMI, Latvia).

2.2. Выделение и идентификация бетулина

Бетулин получали из бересты березы повислой (бородавчатой) – *Betula Pendula Roth*, которая является отходом производства фанерных фабрик.

200 г абсолютно сухой измельченной бересты нагревали до температуры кипения (~ 55 °C) с 2 л метил-трет-бутилового эфира (МТБЭ) и выдерживали при этой температуре в течение 4 ч. Затем смесь фильтровали и экстрагировали МТБЭ (3 × 50 мл), после чего экстракт концентрировали отгонкой МТБЭ на вакуумном испарителе. К полученному остатку добавляли 400 мл 1 %-ного раствора NaOH и нагревали. К щелочному раствору без охлаждения добавляли 600 мл воды и нагревали 1 ч до выпадения осадка. Водный слой сливали, а твердый влажный осадок сушили на воздухе. Получали 48.0 г бетулина – сырца (выход 24 % от

массы абсолютно сухой бересты). Затем осуществляли двойную перекристаллизацию из изопропанола. Полученный бетулин был 99.5 %-ной чистоты и имел вид белых игольчатых кристаллов. **Т. пл.** 260 – 261 °С, **R_f** 0.17.

Физико-химические характеристики бетулина соответствовали литературным данным [32]:

ИК – спектр, ν , см⁻¹, (KBr): 3363 ($\nu_{\text{O-H}}$), 3070 ($\nu_{\text{C-H}}$), 2941, 2868 ($\nu_{\text{C-H}_{\text{as,s}}}$), 1643 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1028 ($\nu_{\text{CH}_2\text{OH}}$), 881 ($\delta_{\text{C=CH}_2}$).

Масс – спектр, m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 442(16) [M]⁺, 411(32), 381(15), 234(34), 207(63), 189(100), 175(43), 147(44), 121(74), 107(81).

Спектр ЯМР ¹³C, (CDCl₃, δ , м.д.):

<i>C1</i>	38.9	<i>C2</i>	27.5	<i>C3</i>	79.1	<i>C4</i>	38.9	<i>C5</i>	55.8	<i>C6</i>	18.4
<i>C7</i>	34.5	<i>C8</i>	40.4	<i>C9</i>	50.7	<i>C10</i>	37.8	<i>C11</i>	20.3	<i>C12</i>	25.7
<i>C13</i>	37.6	<i>C14</i>	42.6	<i>C15</i>	27.0	<i>C16</i>	28.9	<i>C17</i>	47.7	<i>C18</i>	48.1
<i>C19</i>	48.3	<i>C20</i>	150.4	<i>C21</i>	29.2	<i>C22</i>	33.7	<i>C23</i>	28.0	<i>C24</i>	15.6
<i>C25</i>	15.8	<i>C26</i>	16.1	<i>C27</i>	14.4	<i>C28</i>	60.6	<i>C29</i>	109.4	<i>C30</i>	19.2

Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д.):

0.76 с (3H, 24-CH₃), 0.82 с (3H, 25-CH₃), 0.96 с (3H, 23-CH₃), 0.98 с (3H, 26-CH₃), 1.00 с (3H, 27-CH₃), 1.02 – 1.95 (комплекс, CH, CH₂), 1.67 с (3H, 30-CH₃), 2.48 с (1H, 19-H) 3.18 дд (1H, J 5.3 Гц, 3-H), 3.33 д (1H, J 10.8 Гц, 28-H); 3.79 д (1H, J 10.8 Гц, 28-H); 4.58 с (1H, 29-H); 4.70 с (1H, 29-H).

2.3. Синтез бетулонового альдегида (образец сравнения для ВЭЖХ) [74]

К 1 г (2,3 ммоль) бетулина при интенсивном перемешивании добавляли 0,8 г (3,7 ммоль) хлорхромата пиридиния и 8 мл сухого дихлорметана. Через 30 минут в реакционную смесь добавляли еще 1 г (2,3 ммоль) бетулина и продолжали перемешивать в течение 1 ч при 25°C. Затем смесь фильтровали через слой силикагеля и промывали 75 мл этилацетата. Фильтрат концентрировали упариванием растворителя, полученный остаток растворяли в

смеси н-гексан – дихлорметан = 1 : 2,8. Твердый остаток чистили колоночной хроматографией: адсорбент – силикагель; элюент – гексан, гексан – этилацетат (50:1 до 5:1). Контроль хода реакции проводили методами ТСХ и ВЭЖХ. Полученный продукт перекристаллизовывали из метанола. Выход бетулонового альдегида составил 0.68 г (67 %), белые кристаллы с т. пл. 163 – 165 °С, R_f 0.66.

ИК – спектр, ν , см^{-1} , (KBr): 2941, 2868 ($\nu_{\text{C-H}_{\text{as,s}}}$), 1730, 1703 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1643 ($\nu_{\text{C=C}}$), 1454 ($\delta_{\text{O-H}}$), 1375 ($\delta_{\text{CH}_3\text{sy}}$), 1024 ($\nu_{\text{C-O}}$), 873 ($\delta_{\text{C=CH}_2}$).

Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 438 (11.5) $[\text{M} - \text{CHO}]^+$, 409 (20), 273 (3.2), 219 (20.2), 205 (38.4), 189 (39.6), 133 (35.6), 105 (55.8), 81 (65), 55 (100).

Спектр ЯМР ^{13}C , (CDCl_3 , δ , м.д.):

<i>C1</i>	38.9	<i>C2</i>	34.0	<i>C3</i>	218.1	<i>C4</i>	47.3	<i>C5</i>	55.0	<i>C6</i>	19.6
<i>C7</i>	33.5	<i>C8</i>	40.9	<i>C9</i>	49.7	<i>C10</i>	36.9	<i>C11</i>	21.3	<i>C12</i>	25.2
<i>C13</i>	38.2	<i>C14</i>	42.8	<i>C15</i>	27.0	<i>C16</i>	29.1	<i>C17</i>	58.7	<i>C18</i>	48.1
<i>C19</i>	47.3	<i>C20</i>	149.6	<i>C21</i>	29.7	<i>C22</i>	33.7	<i>C23</i>	26.6	<i>C24</i>	21.0
<i>C25</i>	15.8	<i>C26</i>	16.1	<i>C27</i>	14.7	<i>C28</i>	206.5	<i>C29</i>	110.2	<i>C30</i>	19.1

Спектр ЯМР ^1H , (CDCl_3 , δ , м.д.):

0.80 с (3H, 24-CH₃), 0.85 с (3H, 23-CH₃), 0.98 с (3H, 27-CH₃), 1.00 с (3H, 25-CH₃), 1.02 с (3H, 26-CH₃), 1.02 – 1.95 (комплекс, CH₂, CH), 1.68 с (3H, 30-CH₃), 2.84 м (1H, 19-H), 4.68 с (1H, 29-H), 4.78 с (1H, 29-H), 9.68 с (1H, 28-CHO).

2.4. Методика синтеза фосфата бетулина

2,0 г (4,52 ммоль) бетулина растворяли в 40 мл диоксана при комнатной температуре. При перемешивании, охлаждая на ледяной бане, вводили 0,72 мл (9,04 ммоль) пиридина и 5,0 мл (54,24 ммоль) POCl₃ (температура в колбе не должна превышать 15°C). Реакцию вели при постоянном перемешивании в течение 36 ч и останавливали, осторожно добавляя при перемешивании и охлаждении около 80 мл ледяной воды. Выпавший белый творожистый осадок отфильтровали, промыли водой и высушили между слоями нетканого материала.

Затем к осадку добавили 50 мл воды и 100 мл 1 М водного раствора NaOH до pH 5,0. Продукт реакции в виде белого осадка отфильтровали.

2.5. Методика синтеза моно- и дисукцинатов бетулина по усовершенствованной методике П.А. Красутского [88]

1) *Сукцинат бетулина*. Смешивали 1,00 г (2,26 ммоль) бетулина, 0,249 г (2,49 ммоль) янтарного ангидрида и 0,462 г (6,79 ммоль) имидазола, добавляли 20 мл сухого дихлорметана. Реакцию вели при постоянном перемешивании в течение 24 часов. Затем при медленном перемешивании добавляли 10 мл 3% HCl до pH=2,0. Органический слой отделяли, а водный слой экстрагировали дихлорметаном (3 × 5 мл). Объединенные органические фракции промывали 3% HCl (2 × 10 мл) и сушили безводным сульфатом натрия. Растворитель удаляли под вакуумом, после чего получали 0,78 г (1,44 ммоль) белого порошка. В продукт добавляли 1 мл ацетона, сушили и получали 0,60 г белого порошка, содержащего смесь моно- и дисукцинатов в молярном соотношении 60:40.

2) *Дисукцинат бетулина*. Смешивали 0,50 г (1,13 ммоль) бетулина, 0,34 г (3,40 ммоль) янтарного ангидрида и 0,46 г (6,76 ммоль) имидазола, добавляли 15 мл сухого дихлорметана. Реакцию вели при постоянном перемешивании в течение 12 часов. Затем при медленном перемешивании добавляли 10 мл 3% HCl. Органический слой отделяли, а водный слой экстрагировали дихлорметаном (3 × 5 мл). Объединенные органические фракции промывали 3% HCl (2 × 10 мл) и сушили безводным сульфатом натрия. Растворитель удаляли под вакуумом, после чего получали 0,71 г (1,10 ммоль) порошка желтоватого цвета. Перекристаллизация из смеси хлороформ-гексан давала 0,65 г (1,02 ммоль) порошка желтоватого оттенка.

2.6. Методика синтеза диацетата бетулина по усовершенствованной методике А.Н. Кислицына [23]

В реактор загружали 3,0 г (6,776 ммоль) бетулина, 16,2 г (0,184 моль) этилацетата, 16,2 г (0,270 моль) уксусной кислоты и 150 мг п-ТСК, и нагревали до температуры кипения. После конденсации в дефлегматоре образующиеся пары попадали в устройство для избирательного удаления воды, в качестве адсорбента использовали силикагель. Обезвоженный дистиллят возвращали в реактор. Реакцию проводили при температуре кипения в течение 4 ч. Реакцию останавливали упариванием растворителя и охлаждением полученной смеси до 5-10°C для кристаллизации диацетата бетулина. Перекристаллизацию продукта проводили из изопропанола (массовое соотношение диацетат: спирт - 1:10) при 20-25°C.

2.7. Синтез бетулоновой кислоты [79]

1) *Приготовление окислительной смеси:* 3 г (10 ммоль) дихромата калия растворяли при нагревании в 20 мл воды, добавляли 9,2 г гранул оксида алюминия ($S_{уд} = 800 \text{ м}^2 / \text{г}$) и 5 мл концентрированной серной кислоты. Полученный реактив выдерживали на водяной бане при 20-25°C в течение 10 мин.

2) *Приготовление реакционной смеси:* 1,5 г (3,4 ммоль) бетулина растворяли в 138 мл ацетона, обрабатывали УЗ при частоте 44 кГц в течение 1 – 2 мин до образования молочно-белой суспензии. Смесь выдерживали при 25°C в течение 15 мин при интенсивном перемешивании.

Окислительную смесь добавляли к приготовленной суспензии бетулина в ацетоне и перемешивали в течение 1,5 ч. Затем надосадочную жидкость декантировали от гранул с осадком, приливали к ней 500 мл воды. Всплывающие

при этом белые хлопья отфильтровывали. Полученный осадок многократно промывали на фильтре водой (6×50 мл) и сушили при температуре 105 ± 5 °С.

2.8. Методика определения карбонильного числа [1, 4]

4 г (57,56 ммоль) гидроксиламина солянокислого растворили в 8 мл воды и добавили 80 мл этанола. Затем при перемешивании добавили 60 мл 0,5 моль/л спиртового раствора гидроксида калия и 10 мл раствора бромфенолового синего. Полученную смесь быстро фильтровали.

2 г (4,4 ммоль) бетулоновой кислоты помещали в колбу, приливали 75 мл приготовленного раствора гидроксиламина и кипятили смесь в течение 1 ч на водяной бане. После охлаждения раствора избыток основания оттитровывали 0.5 моль/л раствором хлористоводородной кислоты до перехода фиолетовой окраски в жёлтую. Параллельно проводили контрольный опыт. Разница между объемами титранта, затраченными на титрование контрольного опыта и испытуемого вещества, указывает на количество гидроксиламина, которое израсходовалось на окисмирование группы C=O. 1 моль гидроксида калия эквивалентен 1 молю гидроксиламина, следовательно, расход гидроксида калия служит непосредственной мерой содержания карбонильной группы в соединении. [1, 4] Карбонильное число (КЧ) рассчитывали по формуле

$$\text{КЧ} = \frac{(V_x - V_n) \times 28,05}{a}, \quad (2.1)$$

где V_x – объем хлористоводородной кислоты, пошедшей на титрование контрольного раствора, мл; V_n – объем хлористоводородной кислоты, пошедшей на титрование исследуемого раствора, мл; a – навеска испытуемого соединения, г.

2.9. Анализ масла семян тыквы

Подготовка модельных смесей. Стандартные образцы масла семян тыквы (МСТ): 1- 0,10 г, 2- 0,20 г, 3- 0,30 г растворяли в 50 мл гексана и добавляли 0,1 г тимола. Омыление МСТ проводили в присутствии аскорбиновой кислоты в соответствии с методикой [106].

Растворы стандартов токоферолов, β,β -каротина и β -ситостерола готовили растворением их в 3,0 г МСТ (точная навеска), добавляли 0,2 г тимола и необходимый объем растворов, содержащих рассчитанную концентрацию этих БАВ (5 мг, 10 мг, 20 мг), аскорбиновую кислоту (0,02 г) и 96% этанол (50 мл). Стандартные растворы подвергали омылению и выделению каротиноидов в соответствии с методикой омыления МСТ. [106] Сухие остатки растворяли в 1 мл элюента – смесь этанол / ацетонитрил (15:85) для анализа β -ситостерола и метанол / ацетонитрил / дихлорметан (50: 44: 6) для анализа токоферолов.

Выделение каротиноидов. Гексановый раствор пропускали через колонку с высотой сорбента 10 см (30 - см – длина колонки, 1-1,5 - см - диаметр) со слоем MgO (или CaCO_3 , Al_2O_3). Затем колонку промывали гексаном (2×10 -15 мл) и удаляли растворитель в атмосфере азота.

ОФ-ВЭЖХ-анализ токолов и β -ситостерола проводили после отделения каротиноидов. *Условия анализа токолов:* 284 нм и 295 нм при 30°C. Подвижная фаза: метанол – ацетонитрил – дихлорметан (50 : 44 : 6, об.%). Скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин в изократическом режиме. *Условия анализа β -ситостерола:* 210 нм при 40°C. Подвижная фаза: ацетонитрил – этанол (85 : 15, об.%). Скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин в изократическом режиме.

Количественное определение суммы каротиноидов выполняли методом спектрофотометрии в соответствии с работой [106] и рассчитывали по формуле: [98]

$$m, \text{мг} = \frac{(A_{\text{набл.}} - b) \cdot V(\text{мл})}{E_{1\text{см}}^{1\%}} \cdot C^o (\text{мг} / \text{мл}) \quad (2.2)$$

где $A_{набл.}$ – оптическая плотность исследуемого раствора масла семян тыквы в гексане; b – поправка оптической плотности по отношению к базовой линии; V – анализируемый объем раствора, мл; $E_{1\%}^{1\text{см}}$ – удельные коэффициенты экстинкции, равные для β, β -каротин-3,3`-диола в гексане – 2480 и для  $\alpha, \beta$ -каротин-3,3`-диола в гексане – 2550; C° – концентрация 1% раствора, равная 10 мг/мл.

2.10. Определение неорганических примесей методом ААС

Качественное определение примеси хрома, вольфрама и молибдена в бетулоновой кислоте проводили на атомно-абсорбционном спектрофотометре с электротермической атомизацией при использовании ламп с полым катодом на соответствующие элементы при $\lambda = 358$ нм (Cr), 255 нм (W) и 313 нм (Mo) в газовой среде аргона. Объем пробы – 20 μL .

2.11. Исследование гипOLIпидемической и гипохолестеринемической активностей предлагаемого препарата

Исследование действия капсул с производными и эфирами бетулина в масле семян тыквы на восстановление уровня холестерина и триглицеридов в крови крыс проводилось на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории «Нижегородской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Животные. В экспериментах были использованы самцы белых нелинейных крыс в возрасте 1-2 месяца.

Источник животных. НПП «Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН».

Карантин/адаптация. Прибывшие животные до начала исследования были помещены в отдельную комнату на период адаптации (14 дней). Во время этого

периода у животных контролировали проявление отклонений в состоянии здоровья согласно Стандартной операционной процедуре (СОП) лаборатории «Прием животных, карантин, адаптация».

Распределение по группам. Животных распределяли по группам случайным образом.

Идентификация. Каждому животному был присвоен индивидуальный номер, в соответствии с которым животному ставилась метка окраской красителями (эозин и метиленовый синий) поверхности хвоста по разработанным схемам. На этикетке клетки определенного цвета указывали группу, номер животного, метку, код исследования, руководителя.

Содержание и уход. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, данным в руководстве *Guide for care and use of laboratory animals. ILAR publication, 1996, National Academy Press*. Все процедуры по рутинному уходу за животными выполняли в соответствии с СОП лаборатории.

Время проведения экспериментов. Эксперименты проводились в летнее время года (8-24 июня 2014 года).

Процедура введения вещества. Изучение гипополипидемического действия препарата проводилось при внутрижелудочном введении.

Раствор вводили *per os* через металлический атравматический зонд. В качестве контрольного вещества использовали масло расторопши.

Моделирование гиперлипидемии. Экспериментальную гиперлипидемию вызывали на фоне однократного введения внутрибрюшинно неионного детергента Твина-80 из расчета 200 мг на 100 г массы тела в дистиллированной воде (1:2 по массе).

Введение исследуемого состава осуществляли согласно п.1.3. Расчет доз исходил из учета массы тела животных и терапевтической дозы действующих веществ (10 мг/кг).

Рассчитанная суточная доза препарата производных бетулина для крысы составила 10 мг/кг по действующим веществам (0,5 г готовой лекарственной

формы на 250 г массы тела). Эквитерапевтическая доза для человека массой 70 кг с учетом межвидового переноса составляет 1,8 мг/кг. Исследования были проведены при однократном внутривенном введении препарата.

Исследования выполнены на 6-ти группах животных (n=30):

1. Интактные (n=5 самцы);
2. Контроль (без лечения) (n=5 самцы);
3. Контроль (масло расторопши) (n=5 самцы);
4. Препарат с диацетатом бетулина (n=5 самцы);
5. Препарат с бетулоновой кислотой (n=5 самцы);
6. Препарат с диацетатом бетулина и бетулоновой кислотой «Бетулитим» (n=5 самцы).

Введение препарата осуществляли однократно одновременно с Твином-80. Через 12 ч после инъекции Твина-80 животным ввели внутривенно 0,2 мл гепарина для предотвращения свертываемости крови. Через 5 минут после инъекции животных декапитировали. Кровь собирали в центрифужные пробирки с 0,2 мл гепарина в объеме 5-6 мл. После центрифугирования (15 мин, 1500 об./мин) в плазме крови определяли содержание общего холестерина и триглицеридов.

Вес тела определяли с помощью весов A&D EK-400H (USA). Точность используемых весов была верифицирована до начала исследования. Взвешивание животных проводилось в соответствии с СОП лаборатории.

Уровень холестерина и триглицеридов устанавливали с помощью тест-наборов Vital на спектрофотометре Unico в соответствии с СОП лаборатории.

Эффективность препарата исследовали в соответствии с руководством по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ. [20]

Методы статистической обработки данных. Полученные результаты были обработаны с помощью пакетов прикладных программ Statistica 7,0. Вероятность различий показателей средних в группах определяли с использованием критерия t-Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Одной из важных проблем получения чистых лекарственных веществ как фармацевтических субстанций является присутствие остаточных растворителей, которые трудно удаляются и способны проявлять токсическое действие. [63, 108] Бетулин как димерная структура способен образовывать полиморфные и псевдополиморфные (сольватные) формы с органическими растворителями. [21] Образование димеров бетулина и комплексов включения, вероятно, объясняется стремлением принять энергетически выгодную форму, характеризующуюся минимумом свободной энергии за счет гидрофобных взаимодействий и сил Ван – дер – Ваальса близко прилегающих друг к другу атомов (Рисунок 3.1).

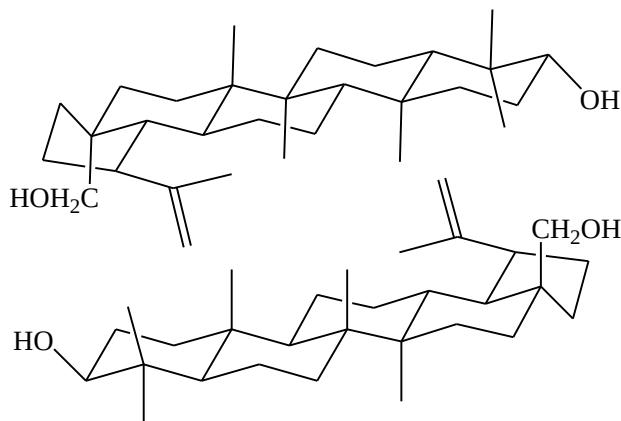


Рисунок 3.1. Димерная структура бетулина

В псевдополиморфных формах бетулина межмолекулярные взаимодействия молекул бетулина друг с другом также будут различаться и определять такое важное свойство для синтеза липофильных производных бетулина как растворимость. В свою очередь гомогенность реакционной смеси является важнейшим фактором в обеспечении селективности окисления и этерификации такой сложной молекулы как бетулин.

При кристаллизации бетулина из растворителей различной полярности выделяют его псевдополиморфные формы (сольваты), которые по данным рентгеноструктурного анализа являются комплексами включения.

В работе [21] были проведены исследования рентгенограмм сольватов бетулина с различными растворителями. Их анализ позволяет предположить, что они имеют структуру клатратного типа, поскольку растворители входят в кристаллическую решетку бетулина и определенным образом связываются с молекулами бетулина. Наиболее стабильными являются сольваты бетулина с бутанолом, этилацетатом, хлороформом и дихлорметаном, а сольваты, полученные из ацетона, метанола, этанола и пропанола, являются нестабильными и теряют растворитель при хранении даже при комнатной температуре. Следовательно, выбор растворителей для синтеза и выделения продукта, а также выявление условий гомогенности в реакционной зоне, является крайне важным для обеспечения селективности при синтезе ЛВ.

3.1. Расчет фармакологической активности производных бетулина в программе PASS

Для предсказания гипополидемического и гипохолестеринемического эффектов бетулина и его производных нами выполнен расчет фармакологической активности интересующих соединений в программе PASS - prediction of activity spectra for substances. [43]

Анализ зависимости биологической активности от структуры молекулы вещества в программе PASS показал, что все изучаемые производные бетулина в высокой степени проявляют гепатопротекторную, гипополидемическую и гипохолестеринемическую активность, которая не уступает главным аналогам (Таблица 3.1). Общность свойств производных бетулина можно объяснить механизмом биотрансформации, который заключается в превращении их в организме в бетулоновую кислоту под действием ряда микроорганизмов. Среди продуктов их биотрансформации обнаруживаются одинаковые метаболиты, что подтверждает эту теорию. [62, 66, 78, 81]

Таблица 3.1.

Результаты расчета фармакологической активности в программе PASS

Действующее вещество	Активность (проявление активности / нежелательные эффекты)						
	Гепато- протектор	Гиполипи- демическая	Гипохолесте- ринемическая	Противовоспа- лительная	Противо- опухолевое	Противо- вирусное	Иммуно- депрессант
Бетулин	0,955 / 0,002	0,663 / 0,017	0,539 / 0,030	0,627 / 0,026	0,948 / 0,004	0,576 / 0,015	0,738 / 0,012
Аллобетулин	0,680 / 0,008	0,513 / 0,035	0,467 / 0,046	0,656 / 0,022	0,950 / 0,004	0,675 / 0,007	0,521 / 0,039
Бетулиновый альдегид	0,904 / 0,002	0,457 / 0,045	0,354 / 0,079	0,534 / 0,047	0,943 / 0,004	0,415 / 0,029	0,696 / 0,017
Бетулиновая кислота	0,952 / 0,002	0,670 / 0,016	0,564 / 0,025	0,740 / 0,011	0,925 / 0,005	0,595 / 0,013	0,723 / 0,014
Бетулоновый альдегид	0,747 / 0,005	-	0,217 / 0,195	0,554 / 0,042	0,952 / 0,004	0,312 / 0,082	0,625 / 0,026
Бетулоновая кислота	0,855 / 0,003	0,781 / 0,007	0,401 / 0,064	0,756 / 0,010	0,928 / 0,005	0,530 / 0,019	0,679 / 0,020
Диацетат бетулина	0,928 / 0,002	0,644 / 0,019	0,569 / 0,024	0,697 / 0,016	0,952 / 0,004	0,483 / 0,031	0,776 / 0,008
Моносукцинат бетулина	0,969 / 0,001	0,722 / 0,012	0,670 / 0,011	0,658 / 0,021	0,908 / 0,005	0,502 / 0,024	0,762 / 0,009
Дисукцинат бетулина	0,968 / 0,001	0,739 / 0,011	0,734 / 0,006	0,650 / 0,023	0,919 / 0,005	0,503 / 0,023	0,764 / 0,009
Монофосфат бетулина	0,875 / 0,003	0,540 / 0,031	0,294 / 0,112	0,491 / 0,060	0,898 / 0,005	0,648 / 0,009	0,758 / 0,010
Дифосфат бетулина	0,732 / 0,006	0,414 / 0,054	0,426 / 0,008	0,829 / 0,005	0,846 / 0,007	0,368 / 0,050	0,705 / 0,016
Аргинин	0,598 / 0,010	-	0,240 / 0,085	0,209 / 0,174	0,417 / 0,016	0,767 / 0,004	0,229 / 0,163
Фосфатидилинозитол	0,327 / 0,051	0,733 / 0,011	0,622 / 0,016	-	0,242 / 0,044	0,570 / 0,009	0,659 / 0,022
Урсодезоксихолевая кислота	0,945 / 0,003	0,545 / 0,009	0,963 / 0,002	0,570 / 0,038	0,522 / 0,003	0,737 / 0,004	0,759 / 0,010

Полученные данные расчетов фармакологической активности в программе PASS свидетельствуют о том, что бетулин не уступает по гепатопротекторному действию своему главному конкуренту – урсодезоксихолевой кислоте, а по гипополипидемическому действию даже превышает. А эфиры бетулина оказывают еще более сильно выраженные фармакологические свойства, чем бетулин. Показатели гипохолестеринемической активности также находятся на высоком уровне по сравнению с большинством аналогов. Кроме того производные бетулина также обладают высокой противоопухолевой, противовоспалительной и противовирусной активностью.

Выводы по разделу 3.1:

1. Прогнозирование потенциальной фармакологической активности производных бетулина – бетулоновой кислоты, дацетата и дисукцината бетулина, с помощью программы PASS показало их высокую эффективность по отношению к гипополипидемическому, гипохолестеринемическому и гепатопротекторному эффектам.

2. Выбор дифосфата бетулина как потенциальной фармацевтической субстанции обусловлен более высокой биодоступностью этого соединения, вследствие его хорошей растворимости в воде, при относительно меньшей эффективности по сравнению с бетулоновой кислотой, диацетатом и дисукцинатом бетулина.

3.2. Фосфатные производные бетулина с улучшенной гидрофильностью

Фосфаты или эфиры фосфорной кислоты наряду с фосфонатами лекарственных веществ, имеющих карбоксильную или спиртовую группу, представляют собой наибольший интерес как фосфор-содержащие пролекарства. [109] Термин «пролекарство» относится к биологически инертным производным ЛВ, которые подвергаются ферментативному и/или химическому превращению *in*

vivo для освобождения их фармакологически активного ЛС. Фосфатные пролекарства способны не только увеличивать растворимость, соответственно, биодоступность (гидрофильная система) или биопроницаемость (липофильная система), но и участвовать в большинстве метаболических процессов. Фосфор входит в состав нуклеотидов, нуклеиновых кислот, фосфопротеинов, фосфолипидов, фосфорных эфиров углеводов, многих коферментов, а также атомы фосфора способны к образованию богатых энергией связей в макроэргических соединениях: аденозинтрифосфорной кислоте, креатинфосфате и других.

Учитывая высокую концентрацию и большое разнообразие фосфор-содержащих соединений в организме, а также присутствие многочисленных ферментов для метаболизма фосфорных соединений (киназ, фосфорилаз и фосфатаз), можно предположить безопасность и легкость биотрансформации фосфор-содержащих ЛВ. В отличие от сложных эфиров карбоновых кислот, сложные эфиры фосфорной кислоты, как правило, легко гидролизуются щелочными фосфатазами и в литературе отсутствуют данные о проблемах с фармакокинетикой в организме человека. [57, 102, 109]

Производные фосфорной кислоты успешно используются как активные компоненты инъекционных лекарственных форм. Применение данных соединений позволяет, например, свести к минимуму боль в месте инъекции, появление которой связано с осаждением препарата, что приводит к лизису клеток и повреждению тканей. [56]

3.2.1. Синтез и свойства фосфатов бетулина

Несмотря на многочисленные исследования в области синтеза эфиров бетулина до сих пор в литературе отсутствуют препаративные способы получения эфиров фосфорной кислоты. В патенте США (Красутский П.А.) описан способ получения натриевых солей фосфорной кислоты, предполагающий гидролиз

дифосфодихлорида бетулина водой до эфиров фосфорной кислоты бетулина по положению 3 и 28 с последующим воздействием бикарбоната натрия для перевода в динатриевые соли. [88] К сожалению, в литературе, как и в вышеупомянутом патенте, отсутствуют какие-либо данные по синтезу и свойствам как дифосфодихлорида бетулина, так и фосфатов бетулина.

Также известен способ получения фосфатов бетулина по патенту А.П. Каплуна и др. [25], заключающийся в обработке бетулина хлорокисью фосфора и трихлоридом фосфора при 90-95°C в течение 24 часов в атмосфере аргона с последующей сложной модификацией. В патенте приведена единственная характеристика дифосфата бетулина (IB): ^1H -ЯМР (CDCl_3 - CD_3OD , 1:1, δ , мд): 0,68-1,99 (42H, 6CH₃, (CH₂)п.м.), 3,61 (1H=CHOP, т.), 3,90 (2H, CH₂OP, д.д.), 4,55, 4,70 (2H, CH₂=C, 2с.).

Наиболее приемлемыми способами синтеза эфиров фосфорной кислоты тритерпеноидов и их солей являются методики получения эфиров фосфорной кислоты стероидов, например, бетаметазона, преднизолон, дексаметазона натрия фосфатов. [87] Большинство методик предполагает воздействие пирофосфорилтетрахлорида или хлорокиси фосфора в органическом растворителе в присутствии акцептора HCl (пиридина, триэтиламина и др.) при низкой температуре с последующим гидролизом водой и переводом эфиров фосфорной кислоты в соли.

Трудностью получения дифосфатов бетулина и их солей является низкая селективность реакции образования дифосфодихлоридов и обратимость реакции гидролитического замещения хлор-ионов в фосфорильной группировке на гидроксильную группу в процессе гидролиза.

В целом, реакция этерификации бетулина оксихлоридом фосфора представлена ниже (схема 3.1).

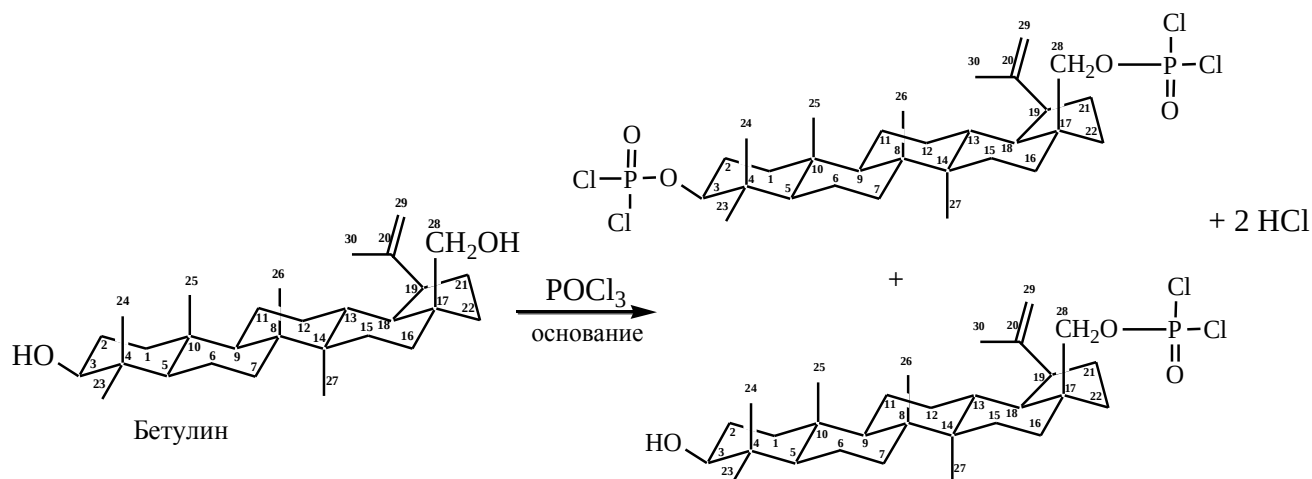


Схема 3.1. Общая схема реакции синтеза фосфохлоридов бетулина

Выход 3,28-О-дифосфодихлорида бетулина зависит от условий протекания реакции: температуры, времени, соотношения между компонентами и акцептора хлористоводородной кислоты.

В качестве акцепторов HCl нами были использованы следующие амины: дибутиламин, триэтиламин, пиридин. Синтез проводился в двух температурных режимах: от 0 до +10°C и при комнатной температуре.

В качестве растворителей были опробованы дихлорметан (не смешивающийся с водой) и 1,4-диоксан (смешивающийся с водой), растворимость бетулина в которых при выбранных условиях была удовлетворительной. Следует отметить, что не всегда обеспечивалась гомогенность реакционной смеси.

В реакционной смеси с дихлорметаном после проведения реакции экстрагируется хлорокись фосфора при добавлении воды и почти полностью удаляется при дальнейшем отмывании водой неводного слоя. В ряде случаев обработку экстрактов проводили щелочными водными или спиртовыми растворами гидроксида натрия до нейтральных pH. После отмывки хлорокиси фосфора из растворов дихлорметана, растворитель удаляли на ротационном испарителе. В большинстве случаев осадки представляли собой белый порошок, в ряде случаев при недостаточном удалении хлорокиси фосфора в присутствии пиридина фильтр и осадки приобретали фиолетовую окраску.

При проведении реакции в смешивающемся с водой диоксане, хлорокись фосфора оставалась в водном растворе после добавления избыточного количества воды при охлаждении. Выпавший осадок непрореагировавшего бетулина и продуктов реакции отделяли фильтрованием, промывали водой или щелочными водными или спиртовыми растворами гидроксида натрия до нейтральных pH. Альтернативным способом обработки реакционной смеси в диоксане является удаление летучих продуктов (растворитель, хлорокись фосфора, хлористый водород, пиридин) на ротационном испарителе под вакуумом с последующей отмывкой продукта.

На основании литературных данных по синтезу фосфатов стеролов нами были проверены соотношения между реагентами бетулин : амин : POCl_3 , которые мы варьировали от 1:1:1 до 1:6:12.

В таблицах 3.2 – 3.7 приведены обобщенные данные по условиям синтеза 3,28-О-дифосфодихлорида бетулина и некоторые свойства выделенных осадков.

Нами показано, что дибутиламин является относительно слабым акцептором HCl и реакция имеет обратимый характер, при этом процесс не зависит от температуры и времени проведения реакции. В ИК-спектре продукта реакции наряду с ожидаемым продуктом (интенсивная полоса валентных колебаний эфирной $\text{C}=\text{O}$ связи 932 см^{-1} , полоса валентных колебаний $\text{O}-\text{P}$ и $\text{O}-\text{P}-\text{Cl}$ связи в области $550-490\text{ см}^{-1}$) наблюдались полосы, отвечающие валентным колебаниям $\text{C}-\text{O}$ спиртовой связи ($1028-1040\text{ см}^{-1}$). Сравнительный коэффициент, равный отношению интенсивности реперной полосы, отвечающей за валентные колебания циклопентанпергидрофенантренового цикла (2940 см^{-1}), к интенсивности реперной полосы в области 500 см^{-1} , характеризующей валентные колебания $\text{O}-\text{P}-\text{Cl}$ связи, должен быть близок к единице. Коэффициент J_{2940}/J_{500} продуктов синтеза в дихлорметане и в диоксане в присутствии дибутиламина имел значения, существенно большие единицы. (Таблицы 3.2, 3.3) В ^{31}P -ЯМР – спектрах продуктов реакции фиксировались в качестве основных сигналов в области 17,5 м.д., что соответствует оксихлориду фосфора. В ^1H -ЯМР-спектрах образцов основным продуктом был исходный бетулин.

Таблица 3.2.

Условия синтеза фосфата бетулина в дихлорметане в присутствии дибутиламина (А)

№	Б:А: POCl ₃	t, °C	τ, ч	Обработка реакционной смеси	ИК, см ⁻¹					J ₂₉₄₀ / J ₅₀₀	ЯМР ³¹ P, м.д.	Выход, %
					4000-3000	1020-1090	980-920	883-881	600-400			
P-142	1:3:2	0	2	H ₂ O (3x70 мл) до pH 6, Na ₂ SO ₄ и удаление Sol	3377	1028	932	883	546 419	2,52	-	5
			4		3362	1036	932	881	546 419	2,75	17,45	3
			24		3365	1028	983 972 931	883	543	1,78	17,46	15
				H ₂ O	3377	1105 1028	984	883	546	3,12	-	5
P-143	1:3:2	25	2	H ₂ O (3x70 мл) до pH 6, Na ₂ SO ₄ и удаление Sol	3362	1036	932	881	546	2,38	17,49	6
			4		3366 3354	1030	932	883	546	2,10	-	7
			24		3374 3364	1036	932	883	544	1,44	17,49	13
				этанол и NaOH	3109-3354	1014	937	867	663 551	1,10	-	15
			H ₂ O	3385	1028	984	883	546	2,33	17,48	6-7	
P-144	1:4:3	0	2	H ₂ O (3x70 мл) до pH 6, Na ₂ SO ₄ и удаление Sol	3362	1028 1038	932	883	546	1,77	-	15
			4		3356 3337	1038	932	881	546	1,5	17,49	13
			24		3374	1038	932	883	544	1,49	17,49	13
				H ₂ O	3383	1105 1028	984	883	546	3,28	не обн.	3
P-145	1:4:3	25	2	H ₂ O (3x70 мл) до pH 6, Na ₂ SO ₄ и удаление Sol	3362	1036	932	881	546	1,93	-	15
			4		3356 3347	1036	932	883	546	1,74	-	17
			24		3374 3364	1038	932	883	544	1,46	-	18

Таблица 3.2. Продолжение

№	Б:А: POCl ₃	t, °C	τ, ч	Обработка реакционной смеси	ИК, см ⁻¹					J ₂₉₄₀ / J ₅₀₀	ЯМР ³¹ P, м.д.	Выход, %
					4000-3000	1020-1090	980-920	883-881	600-400			
P-146	1:5:4	0	2	H ₂ O (3x70 мл) до pH 6, Na ₂ SO ₄ и удаление Sol	3362	1038	930	883	546	1,31	17,44	15
			4		3362	1038	930	881	544	1,17	-	20
			24		3374 3356	1038	930	883	544	1,25	17,45	18
				H ₂ O	3383	1028	984	883	544 517	2,10	не обн.	15
P-147	1:5:4	25	2	H ₂ O (3x70 мл) до pH 6, Na ₂ SO ₄ и удаление Sol	3362 3345 3335	1038 1007	930	881	546	1,38	-	15
			4		3356	1038	930	883	546	1,58	-	13
			24		3374 3356	1040 1005	930	883	542	1,09	-	17
P-148	1:12:6	25	2	0,1M HCl (40 мл) до pH 6, удаление Sol	3374	1040 1094	930	881	542	1,10	17,44	17
				H ₂ O (100 мл), Na ₂ SO ₄ и удаление Sol	3300	1032	983 943 934	883	498	1,65	Пики не разде- лены	13
P-149	1:12:3	25	2	0,1M HCl (40 мл) до pH 6 удаление Sol	3381(31)	1040	983 970 930	883	542	1,18	17,48	16

Таблица 3.3.

Условия синтеза фосфата бетулина в 1,4-диоксане в присутствии дибутиламина (А)

№	Б:А: POCl ₃	t, °C	τ, мин	Обработка реакционной смеси	ИК, см ⁻¹					J ₂₉₄₀ /J ₅₀₀	Выход, %
					4000-3000	1020-1090	980-920	883-881	600-400		
Р-141	1:3:1	100	30	H ₂ O, фильтрация	3362	1043	984 972	881	545	2,11	10
				+ 1,5% NaHCO ₃ , фильтрация, H ₂ O	3381	1034	984 972	881	546	1,80	12
И-64	1:3,9:1,3	101	30	+ 1,5% NaHCO ₃ до pH=8,0, фильтрация, H ₂ O	3375	1036	970 929	881	546 472	2,34	9
			60		3383	1036	970 929	881	545	2,60	8
			120		3385	1036	970 929	881	546	2,06	9
			180		3385	1036	983 972 930	881	546	2,48	8

Поскольку из данных таблиц 3.2 и 3.3 следует, что выход продуктов, главным образом дифосфодихлор бетулина, увеличивался при увеличении доли оксихлорида фосфора и амина, то в дальнейшем исследования были проведены в избытке реагента. В качестве акцептора протона был использован более сильный депротонирующий агент – триэтиламин. Достоинством использования триэтиламина также является его более легкое удаление за счет лучшей растворимости в воде из реакционной смеси после завершения реакции.

Обработка реакционной смеси в дихлорметане проводилась как удалением растворителя в ротационном испарителе под давлением, так и отмывкой оксихлорида фосфора водой (многократная экстракция солевым раствором и водой). (Таблица 3.4)

Можно отметить, что при проведении реакции хлорфосфорелирования при увеличении времени выдержки (до двух недель) выход реакции увеличивался с 50 до 75 %. Промывка органического слоя спиртовыми или спиртово-водными щелочными растворами приводила к образованию фосфатов бетулина. При этом соотношение J_{2940}/J_{500} снижалось с 4,0 до 1,0, появлялась новая полоса валентных колебаний O-H 3437 см^{-1} , характерная для эфиров фосфорной кислоты.

Проведение реакции бетулина с оксихлоридом фосфора в присутствии триэтиламина в дихлорметане после обработки 0,5 М спиртовым раствором NaOH приводило к образованию натриевой соли фосфата бетулина, поскольку в ^{31}P -ЯМР-спектрах появлялись сигналы, отличные от сигналов исходного реагента и типичные для натриевых солей фосфатидовой кислоты – хим.сдвиг -3,53. (Таблица 3.4)

Более эффективной является обработка реакционной смеси при проведении реакции в диоксане. При выливании реакционной смеси на поверхность колотого льда (или ледяную воду, масса которой 10-кратно превышает массу реакционной смеси) выпадает белый осадок продукта, который легко отмывается от остатков примеси оксихлорида фосфора и продуктов его гидролиза. (Таблица 3.5)

Таблица 3.4.

Условия синтеза фосфата бетулина в дихлорметане в присутствии триэтиламина (А) при 25°C

№	Б:А: POCl ₃	τ, ч	Обработка реакционной смеси	ИК, см ⁻¹					J ₂₉₄₀ /J ₅₀₀	ЯМР ³¹ P, м.д.	Выход, %
				4000-3000	1020-1090	980-920	883-881	600-400			
P-153	1:4:2	2	H ₂ O, Na ₂ SO ₄ и удаление Sol	3377	1028		881	544	4,09	-	30
		24		3374	1028	984	881	546 492	3,92	-	50
P-160	1:1:12	22	удаление Sol	3365	-	-	883	492	1,34	9,79 2,24	60
		2 нед.	удаление Sol		1034	976	883	501 419	3,79	-	52
			10М водн. NaOH до pH=9,0	3445 3375	1070	957	864	538 516	0,68	-	60
			1М водн-спирт NaOH	3437 3123	1011	-	864	617 552 519	1,07	-	62
			1М водн. NaOH	3447	1084	978	883	598 546	2,56	-	30
И-66	1:7:2	2,5	H ₂ O	3393	1034	984	881	546 492	2,94	-	32
И-67	1:0:3	4,5	удаление Sol	3335	1026		883	629 557	1,60	-	45
		24	-	3310	1026	982	883	559	2,38	-	65
		5 сут	-	3412	1036	-	881 851 806	527 463	4,08	-	65

Таблица 3.4. Продолжение

№	Б:А: POCl ₃	τ, ч	Обработка реакционной смеси	ИК, см ⁻¹					J ₂₉₄₀ / J ₅₀₀	ЯМР ³¹ P, м.д.	Выход, %
				4000-3000	1020-1090	980-920	883-881	600-400			
И-68	1:0:3	4	удаление Sol	3383	1028	984	883	546	3,84	-	30
		20		3325	1072 1011	976 (20)	883	563 420 411	1,00	-	60
		1	водн. NaOH,.	3385	1032	-	881	546	2,79	-	20
	1:9:3	0,5	H ₂ O, удаление Sol	3385	1034	945	883	546 519	2,24	-	20
И-79	1:2:12	16	удаление Sol	3323	1030	974	887	610 573 548 513	1,19	-	65
			удаление Sol, спирт. 0,5 М NaOH	3447	1113 1098	980 937	-	598 546 473 419	1,61	4,81 -3,53	60
			удаление Sol, экстракция CHCl ₃ , H ₂ O	-	1030	982 972	881	500	1,49	-	63

Таблица 3.5.

Условия синтеза фосфата бетулина в 1,4-диоксане в присутствии триэтиламина (А) при 25°C

№	Б:А: POCl ₃	τ, ч	Обработка реакционной смеси	ИК, см ⁻¹					J ₂₉₄₀ / J ₅₀₀	ЯМР ³¹ P, м.д.	Выход, %
				4000-3000	1020-1090	980-920	883-881	600-400			
Р-154	1:1:6	17	H ₂ O, ↓, H ₂ O	3414	1033	982	881	594 489	1,33	-	50
			удаление Sol, H ₂ O	3422	1034	974	881	594 489	1,29	-	52
			экстракция этанолом, 1M NaOH до pH=9,0	-	1034	972	856	594 498	2,25	-	51
		40	H ₂ O, ↓, H ₂ O	-	1018	983	881	498	1,29	-	60
И-80	1:2:12	21	удаление Sol	-	1034	974	887	575 473	1,17	1,03	61
			удаление Sol, экстракция этанолом, спирт. 0,5 M NaOH	-	1030	984 974	881	544 501	1,88	-	56
		28 сут.	удаление Sol, экстракция этанолом, водно-спирт. 0,5 M NaOH	-	1084 1015	984	866	733 687 648 548 419	1,22	-	58
			удаление Sol, экстракция этанолом, водно-спирт. 0,5 M NaOH, H ₂ O	3561	1080 1042 1013 982	-	880	741 692 544 548	1,08	-	63

Наилучшие результаты при синтезе фосфата бетулина были получены при использовании в качестве акцептора HCl пиридина. (Таблицы 3.6, 3.7) Синтез оптимален при комнатной температуре, 6- или 12-кратном избытке хлорокиси фосфора в течение суток или более. Общие закономерности обработки реакционной смеси после синтеза были такими же, как и при проведении реакции с триэтиламино. Оптимальным является проведение реакции в диоксане и её остановка выливанием реакционной массы в большой объем ледяной воды. Реакция в диоксане протекает в течение 20-24 часов (условия опыта И-82 и И-85), увеличение времени не изменяло выход и свойства продукта (опыт Р-156 и Р-163).

В процессе выделения дихлордифосфобетулина и отмывания водой образуются фосфаты бетулина:

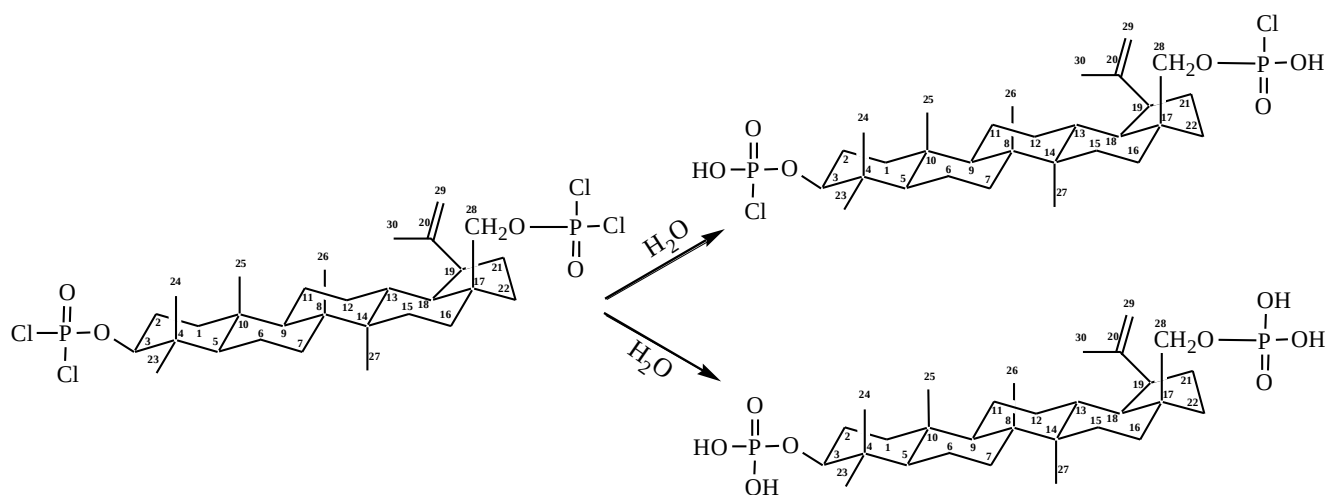


Схема 3.2. Предполагаемые структуры соединений, полученные после отмывания дихлордифосфобетулина

Таблица 3.6.

Условия синтеза фосфата бетулина в дихлорметане в присутствии пиридина (А) при 25°C

№	Б:А: POCl ₃	τ, ч	Обработка реакционной смеси	ИК, см ⁻¹					J ₂₉₄₀ / J ₅₀₀	ЯМР ³¹ P, м.д.	Выход, %
				4000-3000	1020-1090	980-920	883-881	600-400			
Р-158	1:2:12	24	H ₂ O до pH=7,0, Na ₂ SO ₄ , удаление Sol	-	1014 999 984	-	862	577 545 513	1,08	0,38 -0,47 -1,20	64
		2 нед.	удаление Sol	3373-3075	1003		883	494	1,18	-	61
			экстракция этанолом, H ₂ O	3464	1032	976	883	509	7,16	-	58
			экстракция этанолом, 1M NaOH	3462	1011	-	-	606 554	1,31	-	59
И-81	1:2:12	20	удаление Sol	-	999	-	887	610 577 546 513	1,20	-	60
			удаление Sol, H ₂ O	-	1030	974	881	505	9,82	3,81 3,66	58
			удаление Sol, H ₂ O	-	1034	974	883	501	1,73	0,44 -0,40	57
		6 сут.	H ₂ O	-	1032	974	883	492 419	2,15	-	57

Таблица 3.7.

Условия синтеза фосфата бетулина в 1,4-диоксане в присутствии пиридина (А) при 25°C

№	Б:А: POCl ₃	τ, ч	Обработка реакционной смеси		ИК, см ⁻¹					J ₂₉₄₀ / J ₅₀₀	ЯМР ³¹ P, м.д.	Выход, %
					4000-3000	1020-1090	980-920	883-881	600-400			
P-155	1:1:6	17	H ₂ O		3400	1033	983 974	881	498	1,40	-	63
			удаление Sol, H ₂ O		3454	1034	972	881	494	1,30	-	65
			экстракция этанолом, 1M NaOH до pH=9,0		3422 3385	1080 1043	926	881	596 546 507	1,40	-	63
		40	H ₂ O		-	1034	972	882	529 497	1,73	-	60
			экстракция этанолом, 1M NaOH до pH=9,0		3566-3442	1092 1043	980	835	598 528 516 418	1,46	-	64
			H ₂ O, экстракция изопропанолом, 1M NaOH до pH=9,0		3524-3207	1091	980	837	600 527 517	1,57	-	62
P-156	1:1:6	5 сут	H ₂ O, сушка при 95°C	белый пор.	3412	1034	972	881	498	1,58	0,41 -0,43	61
				фиол. пор.	-	1028	976	881	498	1,81	-	59
P-163	1:2:12	43	H ₂ O	1M водн. NaOH	3390	1037	972	880	528 498	1,80	0,34 -0,52	59
				NaHCO ₃ до pH=6,0	3447	1047	932	880	596 540 505	1,51	-	61

Таблица 3.7. Продолжение

№	Б:А: POCl ₃	τ, ч	Обработка реакционной смеси		ИК, см ⁻¹					J ₂₉₄₀ / J ₅₀₀	ЯМР ³¹ P, м.д.	Выход, %
					4000-3000	1020-1090	980-920	883-881	600-400			
И-82	1:2:12	16	удаление Sol	-	3219	999	974	887	610 577 546 513	1,26	1,19	62
				спирт. NaOH	3645	1013	932	827	548 419	1,24	5,81 -3,72	63
			H ₂ O (0°C)		-	1036	970	881	498	2,32	0,10 -0, 76	61
			0,01 М водн. NaOH		3447 3424 3385	1036	972	881	500	1,63	0,48 -0,40	62
И-85	1:2:12	23	удаление Sol	-	3379	1080	1007	887	610 571 546 494	1,41	-	61
				спирт. NaOH 0,1 М до pH=6-7	-	1053	982	930	548 419	1,48	-	61
				H ₂ O	3450	1038	974	883	503	1,95	0,34 -0,54	59

На рисунках 3.2, 3.3, 3.4 приведены ^{13}C -, ^1H - и ^{31}P -ЯМР спектры продукта реакции, полученного в результате синтеза Р-156.

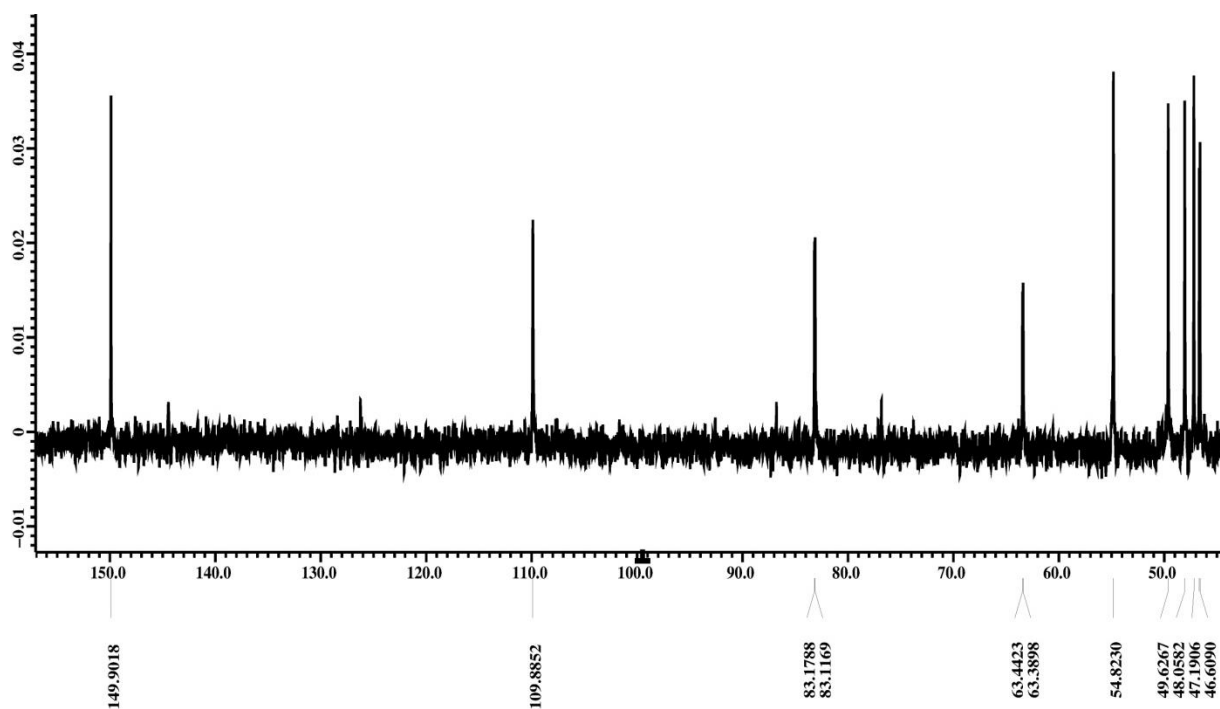


Рисунок 3.2. ^{13}C -ЯМР спектр фосфата бетулина (Синтез Р-156)

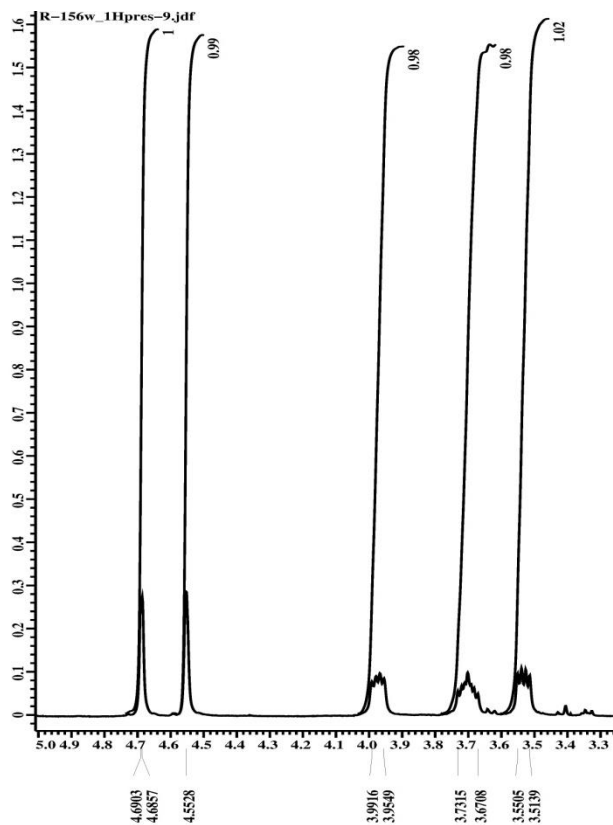


Рисунок 3.3. ^1H -ЯМР спектр фосфата бетулина (Синтез Р-156)

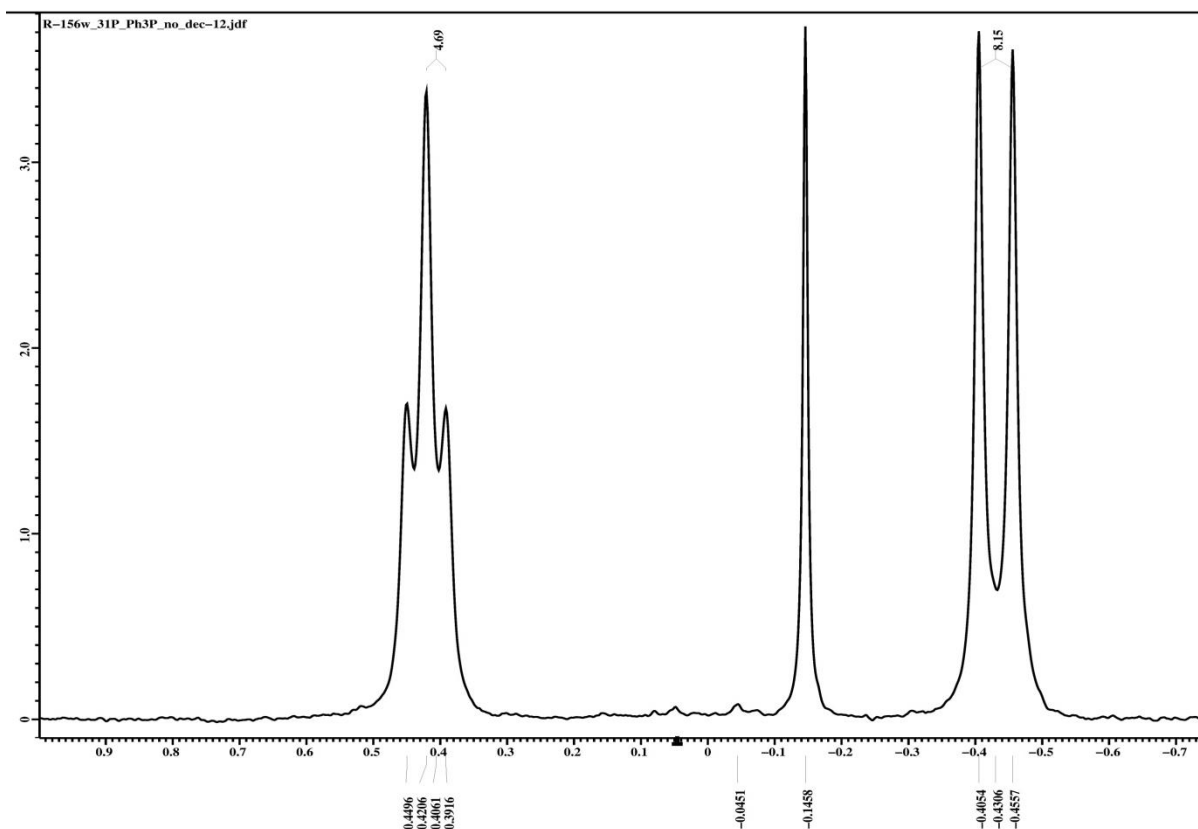


Рисунок 3.4. ^{31}P -ЯМР спектр фосфата бетулина (Синтез Р-156)

В ^{13}C -ЯМР (Рисунок 3.2) спектре фосфата бетулина сигналы бетулина C^{28} и C^3 (60 и 80 м.д. соответственно) атомов смещены на 3 м.д. в более слабое поле, что также характерно для эфиров фосфорной кислоты.

На рисунке 3.4 представлен фрагмент спектра ^{31}P ЯМР образца Р-156 в DMSO- d_6 в присутствии Rh_3P (δ -6 м.д.), добавленного непосредственно перед регистрацией спектра при 30°C. Остаток фосфорной кислоты при 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 CH-O-P . Остаток фосфорной кислоты при 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. [54] Синглет в области $\delta = -0,27$ м.д. соответствует неорганическому фосфату.

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

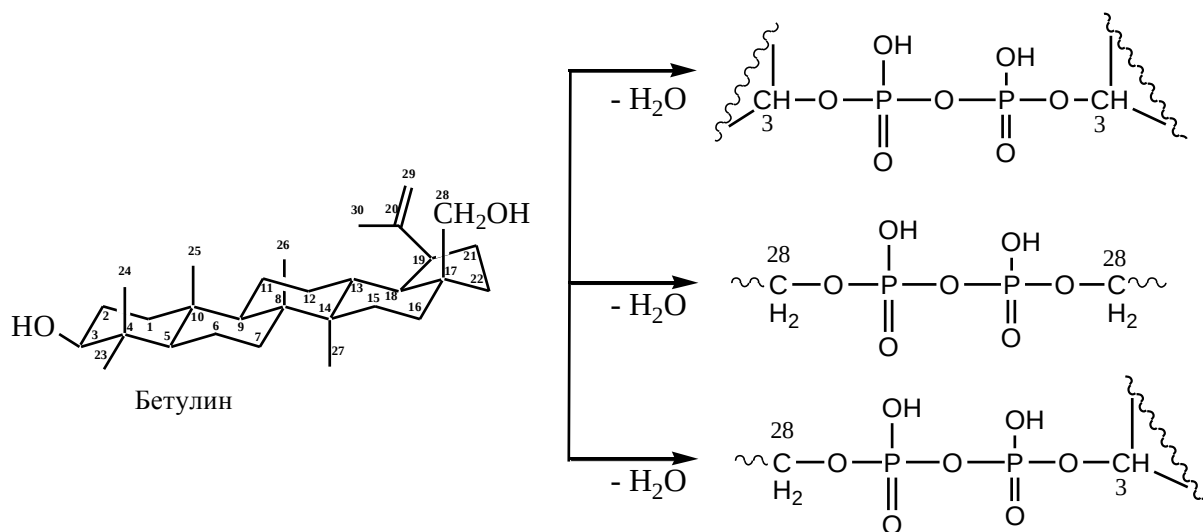


Схема 3.3. Варианты образования пирофосфата бетулина.

Выводы по разделу 3.2:

Таким образом, в результате экспериментов нами показано, что оптимальными условиями синтеза по простоте методики синтеза, а также чистоте и выходу продукта, являются следующие:

1. Растворитель 1,4-диоксан или CH_2Cl_2 .
2. Использование в качестве акцептора HCl пиридина или триэтиламина при молярном соотношении бетулин : амин=1:2.
3. Необходим 6- или 12-кратный избыток POCl_3 .
4. Температура – комнатная.
5. Время – 24 ч (при молярном соотношении бетулин : амин : $\text{POCl}_3 = 1 : 2 : 12$) или время – 48 ч (при молярном соотношении бетулин : амин : $\text{POCl}_3 = 1 : 2 : 6$).

3.3. Синтез бетулоновой кислоты и эфиров бетулина

Ранее было показана принципиальная возможность регулирования селективности окисления бетулина, имеющего три основных реакционных центра – первичная и вторичная спиртовые группы, терминальная кратная связь пентациклического фрагмента, в присутствии кислоты Льюиса Al^{3+} системой $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$. [79] Авторами также было установлено, что в качестве растворителя наиболее перспективна система «ацетон – вода» в массовом соотношении 6:1, позволяющая получить минимальную концентрацию примесей, а в качестве кислот Льюиса можно использовать соли алюминия, оксид алюминия и гетерополикислоты (ГПК). [11, 27, 41]

3.3.1. Синтез бетулоновой кислоты как потенциальной фармацевтической субстанции в присутствии ГПК

Нами проведены сопоставительные эксперименты по синтезу бетулоновой кислоты в присутствии и отсутствии солей алюминия, а также в присутствии ГПК для выявления условий получения максимально очищенного продукта.

Установлено, что одной из причин низкого выхода целевого продукта и наличия большого количества примесей является введение бетулина в виде сольватов с растворителями, а также присутствие остаточных растворителей (изопропанола, этанола, толуола). Нами предложено проводить жесткий контроль качества исходного бетулина по этому параметру и проводить его тщательную сушку при температуре $100 \pm 10^\circ C$ в течение 8-10 часов.

Окисление $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$ в водно-ацетоновой среде в отсутствие Al^{3+} при комнатной температуре ($n=5$) обеспечивало конверсию бетулина $52 \pm 5 \%$, при этом выделяли бетулоновый ($18 \pm 5 \%$) и бетулиновый ($3 \pm 3 \%$) альдегиды, а также продукты окисления по кратной связи в положении C-20 – C-29 ($28 \pm 3 \%$), что согласуется с данными работы. [79]

Из ряда ГПК нами были выбраны фосфорно-вольфрамовая $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ и фосфорно-молибденовая $\text{H}_7[\text{P}(\text{Mo}_2\text{O}_7)_6]$ кислоты, поскольку известна их каталитическая активность в процессах гидратации и окисления. Так, например, окисление пероксидом водорода спиртов различного строения, катализируемого $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$, обеспечивает высокую селективность реакции. [103] Мы полагаем, что высокая селективность реакции обусловлена также способностью гетерополикислоты образовывать сложные комплексы как с растворителями, так и спиртами, улучшая гомогенность системы в целом.

Показано, что основным продуктом реакции в присутствии ГПК – $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$, $\text{H}_7[\text{P}(\text{Mo}_2\text{O}_7)_6]$ в интервале концентраций $5 \cdot 10^{-9}$ – $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л, проводящейся в течение 3 ч при комнатной температуре является, бетулоновая кислота (чистота по ВЭЖХ 95 %). (Схема 3.4.)

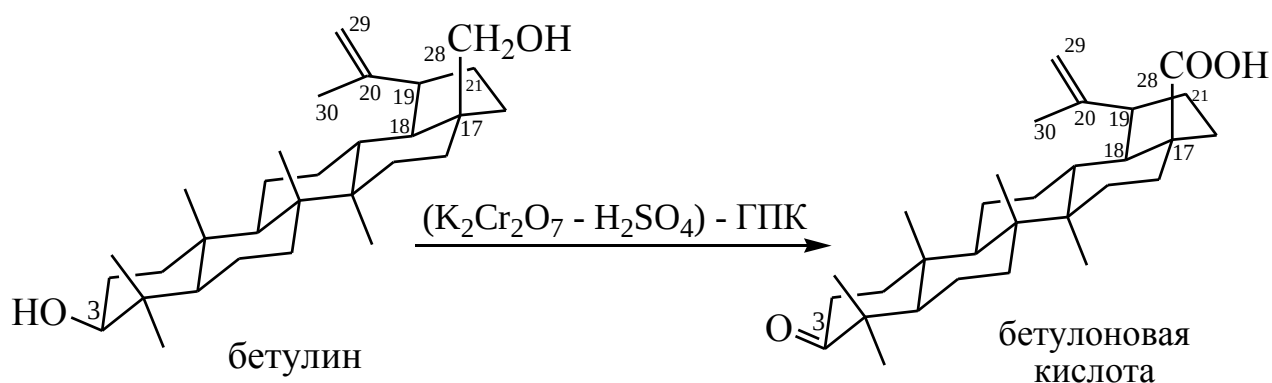


Схема 3.4. Общая схема окисления бетулина системой ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 - \text{H}_2\text{SO}_4$) в присутствии ГПК

Структура бетулоновой кислоты подтверждена ИК– и ЯМР – спектрами (Таблицы 3.8, 3.9, Рисунки 3.5, 3.6).

Интенсивная полоса валентных колебаний $\text{C} = \text{O}$ группы 1705 см^{-1} и совпадение полос валентных и других колебаний в области $1050 - 500 \text{ см}^{-1}$ со стандартом характеризует выделенный продукт как бетулоновую кислоту.

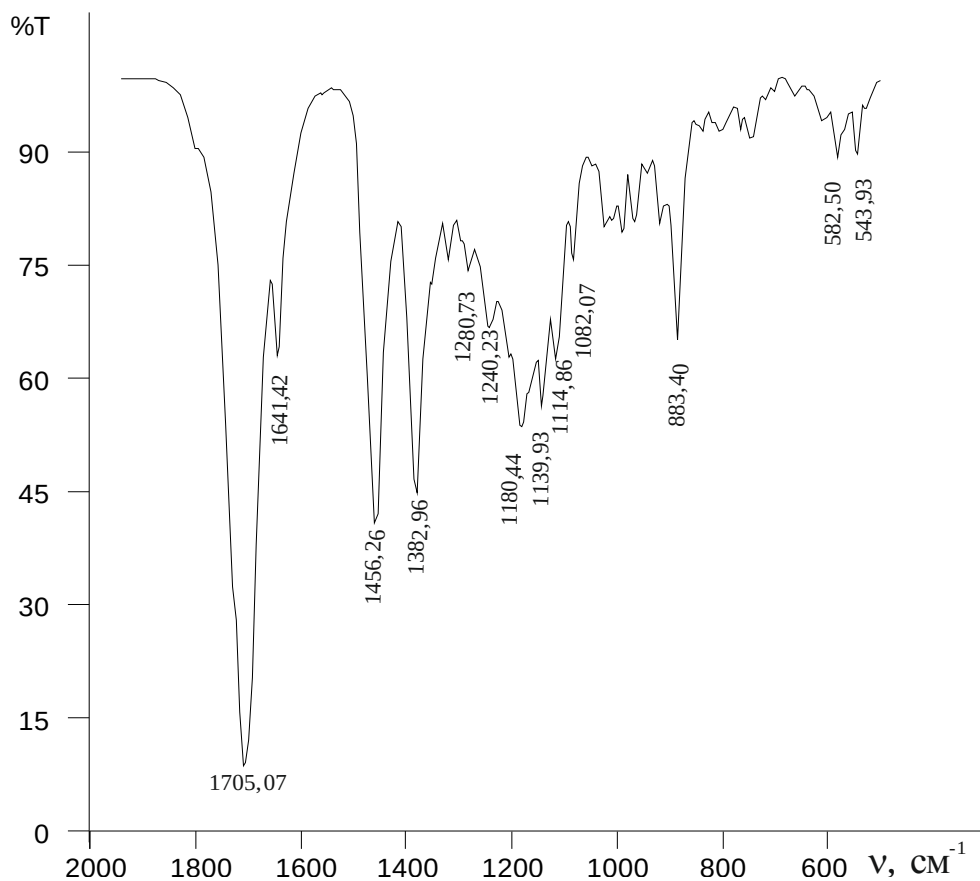


Рисунок 3.5. ИК – спектр продукта окисления бетулина $K_2Cr_2O_7$ ($\nu_{Cr^{6+}}/\nu_{\text{бетулин}}=3:1$) в присутствии $H_3PW_{12}O_{40}$ – бетулоновой кислоты

Таблица 3.8.

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

ГПК	Волновое число, ν cm^{-1}				
	3500–3100	1725–1700	1650–1630	1050–1000	1000–800
	ν_{O-H}	$\nu_{C=O}$	$\nu_{C=C}$	ν_{C-O}	$\delta_{C=CH_2}$
Бетулин	3363 ш.инт.	—	1643 узк.ср.	1028 узк.инт.	883 узк.инт.
$H_3PW_{12}O_{40}$	3412 ш.пер.	1703 узк.инт.	1641 узк.ср.	-	883 узк.инт.
$H_7[P(Mo_2O_7)_6]$	3413 ш.пер.	1705 узк.инт.	1643 узк.ср.	-	883 узк.инт.

Таблица 3.9.

Данные ^1H и ^{13}C ЯМР – спектров продукта окисления бетулина

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 - \text{H}_2\text{SO}_4$ в присутствии гетерополикислот

А. ^1H ЯМР – спектры

Гетерополикислота	Химический сдвиг δ , 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.
$\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$	1.64 с.	2.97 м.	—	—	4.57 с.,
$\text{H}_7[\text{P}(\text{Mo}_2\text{O}_7)_6]$					4.70 с.

Б. ^{13}C ЯМР – спектры

Гетерополикислота	Химический сдвиг δ , м.д.			
	C-3	C-28	C-20	C-29
Бетулин	79.1	60.6	150.4	109.4
$\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$	216.5	177.3	150.3	109.5
$\text{H}_7[\text{P}(\text{Mo}_2\text{O}_7)_6]$				

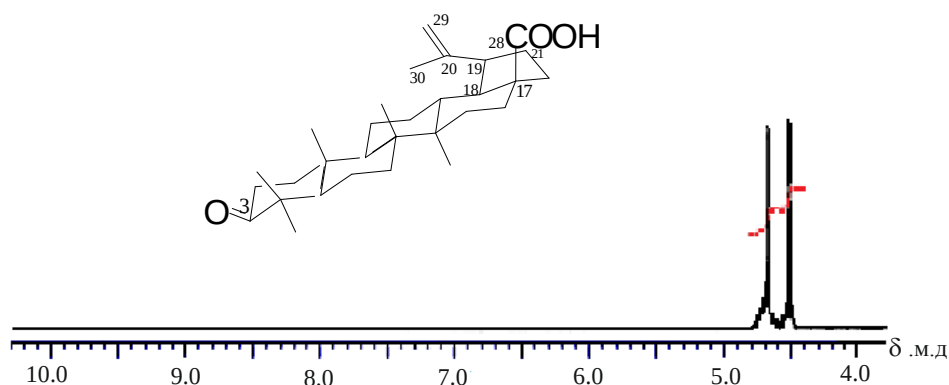


Рисунок 3.6.а. ^1H ЯМР – спектр продукта окисления бетулина $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

($\nu_{\text{Cr}^{6+}}/\nu_{\text{бетулин}} = 3:1$) в присутствии $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ – бетулоновой кислоты

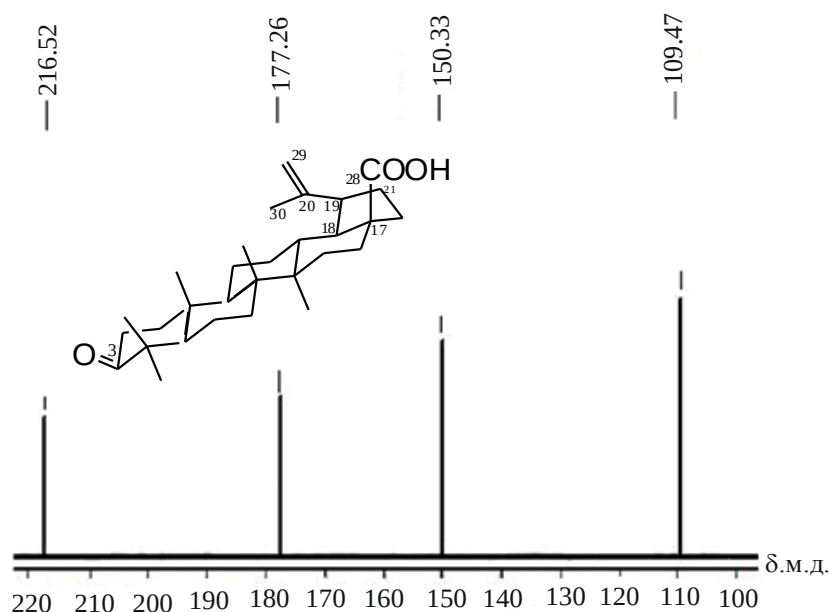
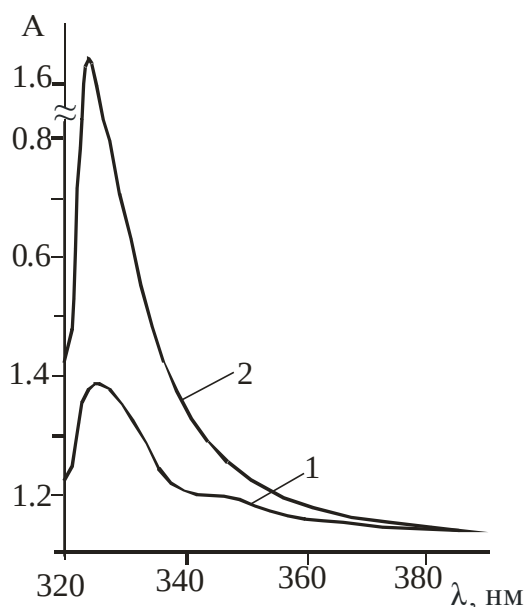


Рисунок 3.6.6. ^{13}C ЯМР – спектр продукта окисления бетулина $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($\nu_{\text{Cr}^{6+}/\nu_{\text{бетулин}}} = 3:1$) в присутствии $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ – бетулоновой кислоты

Особенностью окисления бетулина $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 - \text{H}_2\text{SO}_4$ в присутствии ГПК является моментальная гомогенизация молочно-белой суспензии бетулина в ацетоне и полное растворение бетулина до образования прозрачных растворов с усилением окраски раствора, которые не зависят от порядка добавления окислителя. В УФ-спектре гомогенного раствора бетулина в ацетоне в присутствии ГПК 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). (Рисунок 3.7) Характер растворения и УФ-спектр практически не зависят от природы ГПК.



№ кривой	H ₂ SO ₄	H ₇ [P(MoO ₇) ₆]
1	1,0·10 ⁻³ М	–
2	–	3,3·10 ⁻⁶ М

Рисунок 3.7. УФ – спектры растворов $4,4 \cdot 10^{-5}$ М бетулина в ацетоне

Можно предположить образование комплексов включения в реакционной смеси, аналогичных комплексам бетулина в органических растворителях, таких как бензол, толуол, изопропанол, причем бетулин взаимодействует в виде димерных клатратов по типу «голова – хвост». [7]

Динамика изменения во времени УФ – спектров реакционных смесей «бетулин – окислитель (K₂Cr₂O₇ – H₂SO₄) – H₃PW₁₂O₄₀» (Рисунок 3.8) показала не только изменение поглощения бихроматных комплексов в области 350 нм, но и существенные изменения оптической плотности (A) при 250 и 298 нм, отвечающих за комплексы бетулина с ГПК.

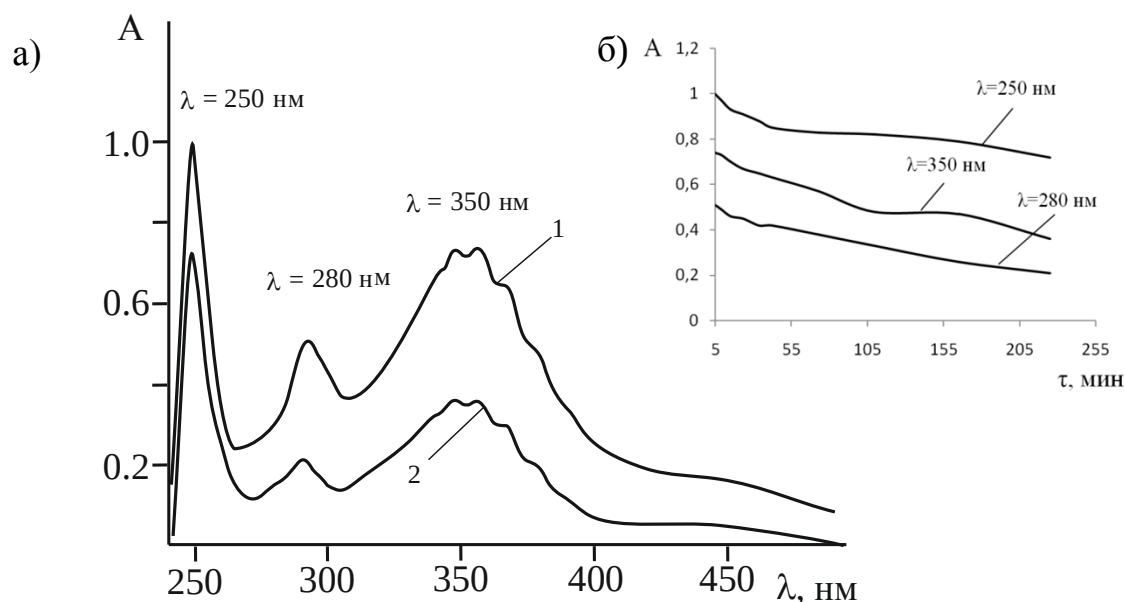


Рисунок 3.8. а) Динамика изменения УФ – спектров реакционных смесей «бетулин – окислитель ($K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$) – $H_3PW_{12}O_{40}$ » во времени: кривая 1 – 5 мин, кривая 2 – 225 мин;
б) Зависимость оптической плотности от времени реакции.

Гетерополиокислоты, имеющие в своем составе элемент с d^0 – конфигурацией, способны образовывать полиоксометаллаты с бихромат-ионами, выступая в качестве лигандов (схема 3.5.).

Роль оксометаллатов, вероятно, сводится не только к структурированию реакционной смеси, но и эффективному разрушению комплексов бетулина с растворителем, коагуляции органических компонентов из реакционной смеси, вследствие чего примесные компоненты лучше удаляются.

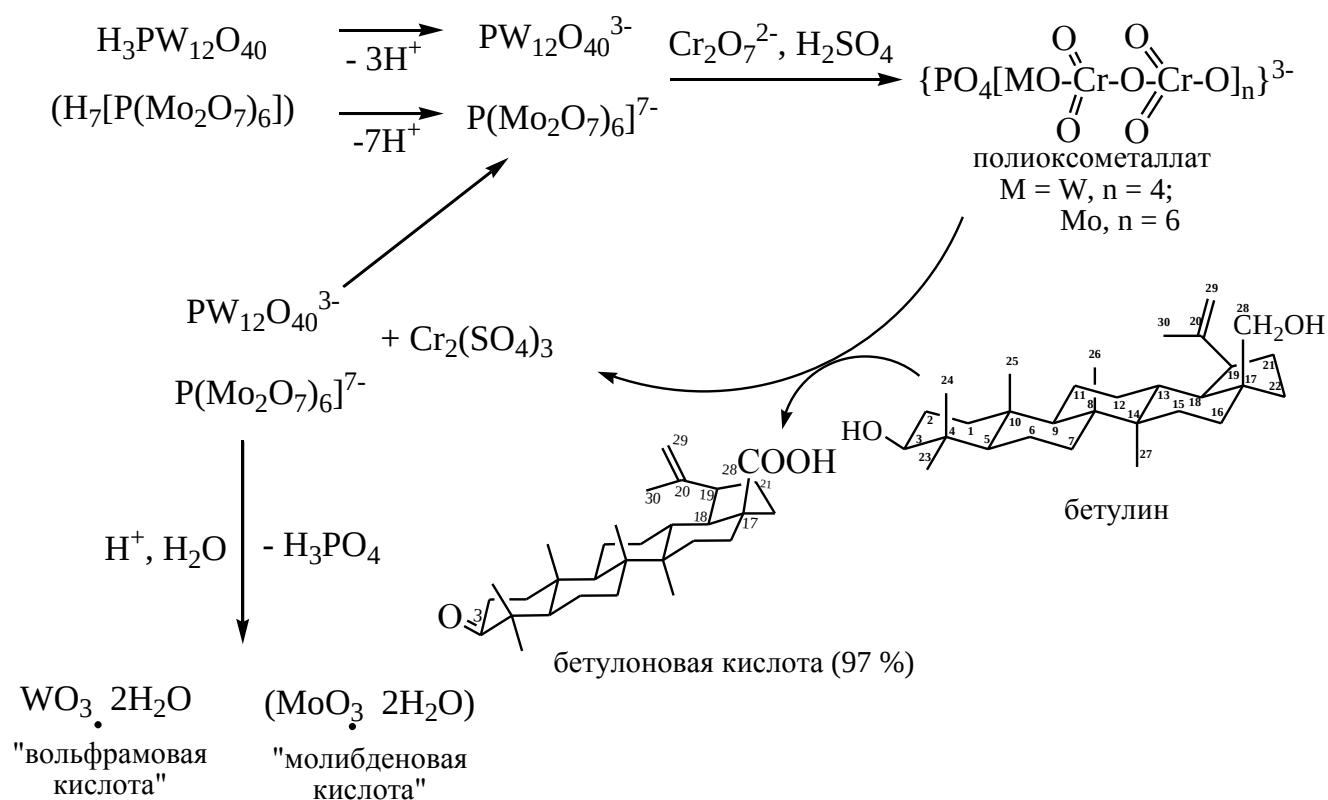


Схема 3.5. Окисление бетулина $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ водно-ацетоновой среде в присутствии ГПК.

Показано, что при добавлении к суспензии бетулина в водно-ацетоновой среде окислительной смеси, содержащей бихромат калия и серную кислоту, в присутствии ГПК первоначально появлялись хорошо растворимые в воде хлопья неорганической природы, состав которых соответствует общей формуле $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot y\text{H}_2\text{O}$. Примеси элементов Р, Мо или W в хлопьевидном осадке не обнаружено (атомная абсорбционная спектрометрия). В течение 15 – 25 мин бесцветные хлопья приобретали зеленую окраску. При этом надосадочная жидкость становилась прозрачной и гомогенной. В осадке содержались только неорганические компоненты. Выделение продукта – бетулоновой кислоты, с количественным выходом проводили через 1.5 – 3 ч добавлением воды к отделённой надосадочной жидкости. Следует отметить, что сырец не требует сложной очистки.

Хромсодержащие полиоксометаллаты после окисления бетулина превращаются в сульфат хрома (III) и регенерированные гетерополикислоты.

Прекращение реакции добавлением большого количества воды в реакционную смесь сопровождается образованием труднорастворимых «вольфрамовой» или «молибденовой» кислот, способные регенерироваться под действием H_3PO_4 (УФ – мониторинг) в соответствии со схемой 3.5.

Главным преимуществом этого синтеза бетулоновой кислоты в водно-ацетоновой среде в присутствии ГПК является проведение процесса при комнатной температуре, в отличие от реакции с реактивом Джонса, протекающей при низких температурах, и возможность получения последней с высоким выходом.

3.3.2. Синтез диацетата бетулина

В таблице 3.10 приведены основные методики синтеза диацетата бетулина, различающиеся по степени экономичности и воспроизводимости результатов. Первую группу составляют методики получения непосредственно из бересты березы. Количественный результат и чистота целевого продукта в значительной степени будут зависеть от качества бересты (ареал произрастания, вид березы, сроки и условия хранения), а также методов очистки, что создает трудности для использования этих методов синтеза для получения фармацевтической субстанции, несмотря на привлекательность прямого получения продукта из исходного сырья.

В этом плане вторая группа методик синтеза диацетата бетулина этерификацией чистого бетулина является более подходящей для фармацевтической промышленности. Нами был выполнен синтез диацетата бетулина этерификацией уксусной кислотой в присутствии катализаторов (п-ТСК, либо H_3PO_4) по методикам А.Н. Кислицына [23] и В.А. Левданского [24], в которых не используется уксусный ангидрид, являющийся прекурсором (Таблица 3.10).

Таблица 3.10.

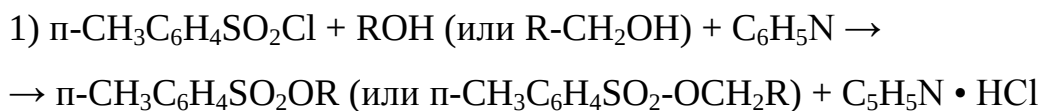
Результаты получения диацетата бетулина в лаборатории НижГМА
по разным методикам

Источник	Кислицын А.Н. [23]	Усовершенствованная методика по Кислицыну	Левданский В.А. [24]	Сымон А.В. [46]
Реактивы	Бетулин, ЭА*, CH ₃ COOH, п-ТСК** (Б:п-ТСК = 10:1)	Бетулин, ЭА*, CH ₃ COOH, п-ТСК**, SiO ₂ (Б:п-ТСК = 1:8)	Бетулин, CH ₃ COOH, H ₃ PO ₄	Бетулин, уксусный ангидрид
Температура, °C	Кип.	Кип.	Кип.	Кип.
Время, ч	4	4	1,5	До полного растворения
Выход, %	90	96±2, n=5	95 (65±3, n=5****)	64 (64±3, n=5****)
Примеси ***	Бетулин 0,1% моноацетат 2,9% Неидентиф. вещества 6,9%	моноацетат 0,9% Неидентиф. вещества 3,1%	Бетулин 2%, моноацетат 13 %, неидентиф. вещества 20 %	Бетулин, моноацетат, неидентиф. вещества

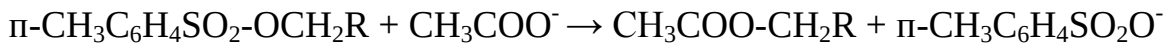
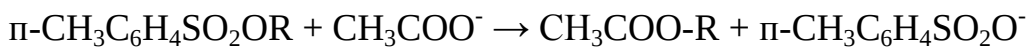
Примечания: * ЭА – этилацетат; **п-ТСК – пара-толуолсульфокислота; ***наши данные по выходу диацетата.

Наибольшая чистота продукта с максимальным выходом достигалась синтезом по усовершенствованной методике А.Н. Кислицына. [23]

Для синтеза была использована общепринятая тенденция этерификации бетулина с использованием связующих агентов (coupling agent). Защита или связывание спиртовых групп основывается на взаимодействии спиртовых групп с соединениями, способными быстро заместить протон спиртовых групп в присутствии сильного акцептора протонов. Можно предположить, что наиболее полно этот процесс описан для п-толуолсульфонилхлорида:



2) На втором этапе протекает реакция замещения:



Требование к связывающему агенту – он должен легко образовывать анионы, например, благодаря легкости образования анионов TsO^- , тозилаты являются эффективными защитными группами. Отношение связующего агента к одной спиртовой группе должно быть 4 : 1. Поскольку бетулин имеет две спиртовые группы, то молярное соотношение бетулина к п-ТСК нами было принято 1 : 8, в отличие от молярного соотношения в методике Кислицына 1 : 0,1.

В качестве дегидратирующего реагента нами использовался силикагель, а также синтез проводился в условиях удаления воды с помощью насадки Дина-Старка. В предлагаемой схеме не требуется использование производных пиридина, как акцептора протона, так как не образуется HCl .

Общая схема реакции получения диацетата бетулина приведена на схеме 3.6.

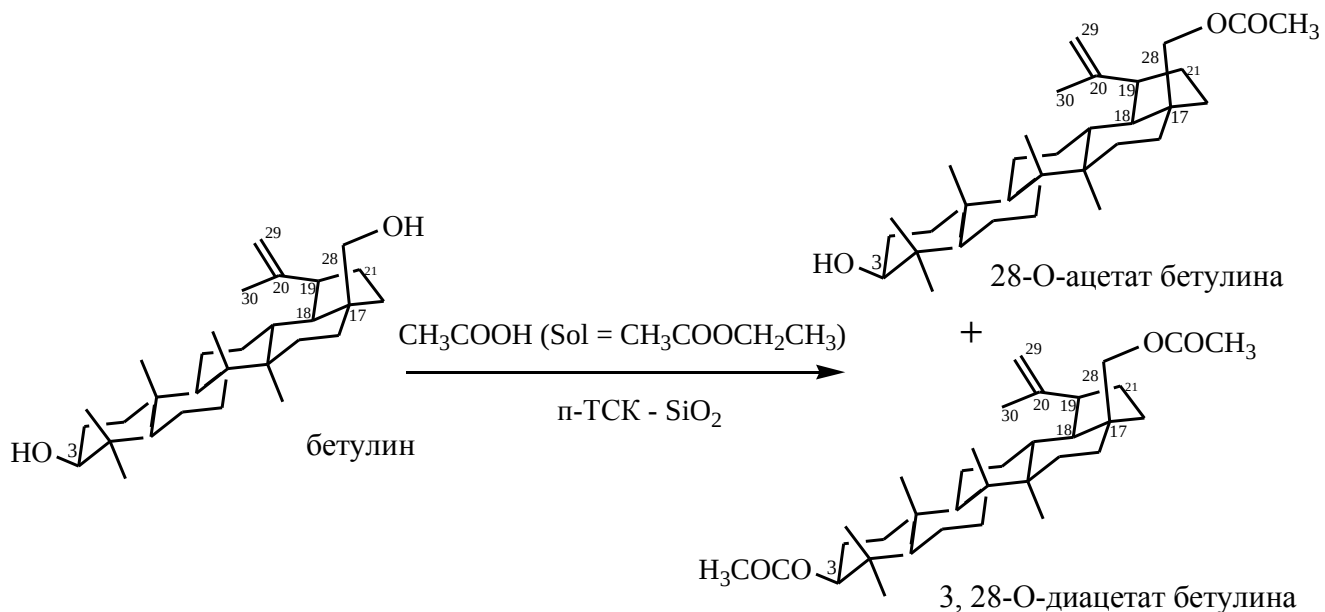


Схема 3.6. Получение диацетата бетулина по Кислицыну [23]

ВЭЖ – хроматограмма целевого продукта, полученного по Кислицыну [23] и очищенного перекристаллизацией в изопропанол, приведена на рисунке 3.9.

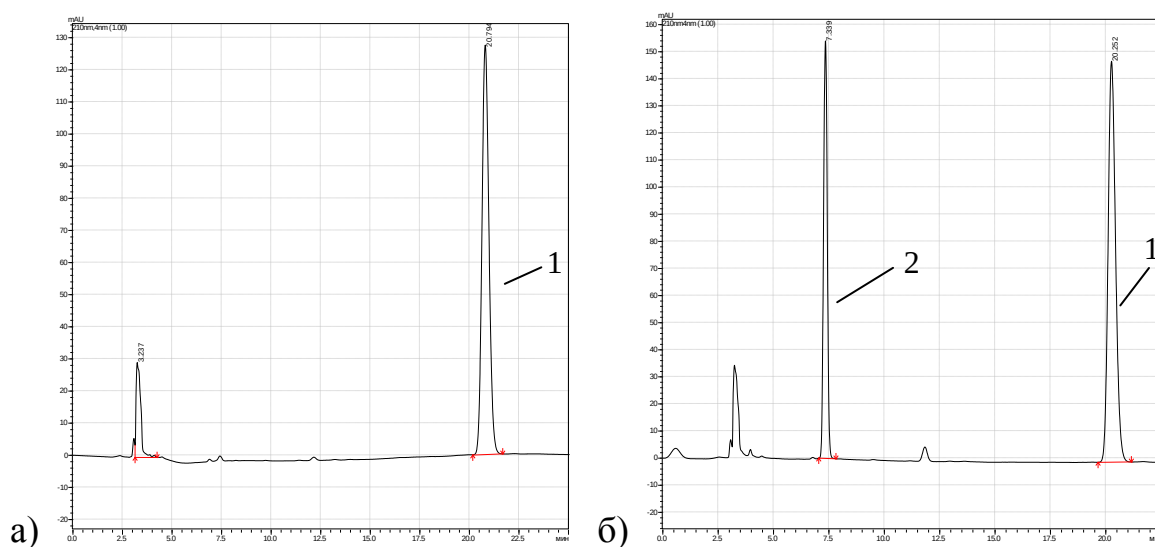


Рисунок 3.9. ОФ-ВЭЖХ диацетата бетулина. Время удерживания – 20,79 мин.

а) очищенный продукт синтеза по Кислицыну (пик 1);

б) продукт синтеза по Кислицыну (пик 1) с введением в пробу бетулина (пик 2).

Время удерживания 2,6 мин соответствует примеси в ацетонитриле.

В качестве основных примесей по данным ОФ-ВЭЖХ-анализа выступали бетулин и моноацетат бетулина, концентрация которого по В.А. Левданскому достигала 40% по отношению к диацетату. В качестве иллюстрации образования двух основных продуктов по Левданскому на рисунке 3.10 приведены ИК-спектры исходного бетулина и перекристаллизованных продуктов реакции по сопоставляемым методикам (2 полосы для двух циклопентанпергидрофенантеновых циклов с $\nu = 2943$ и 2926 см^{-1}).

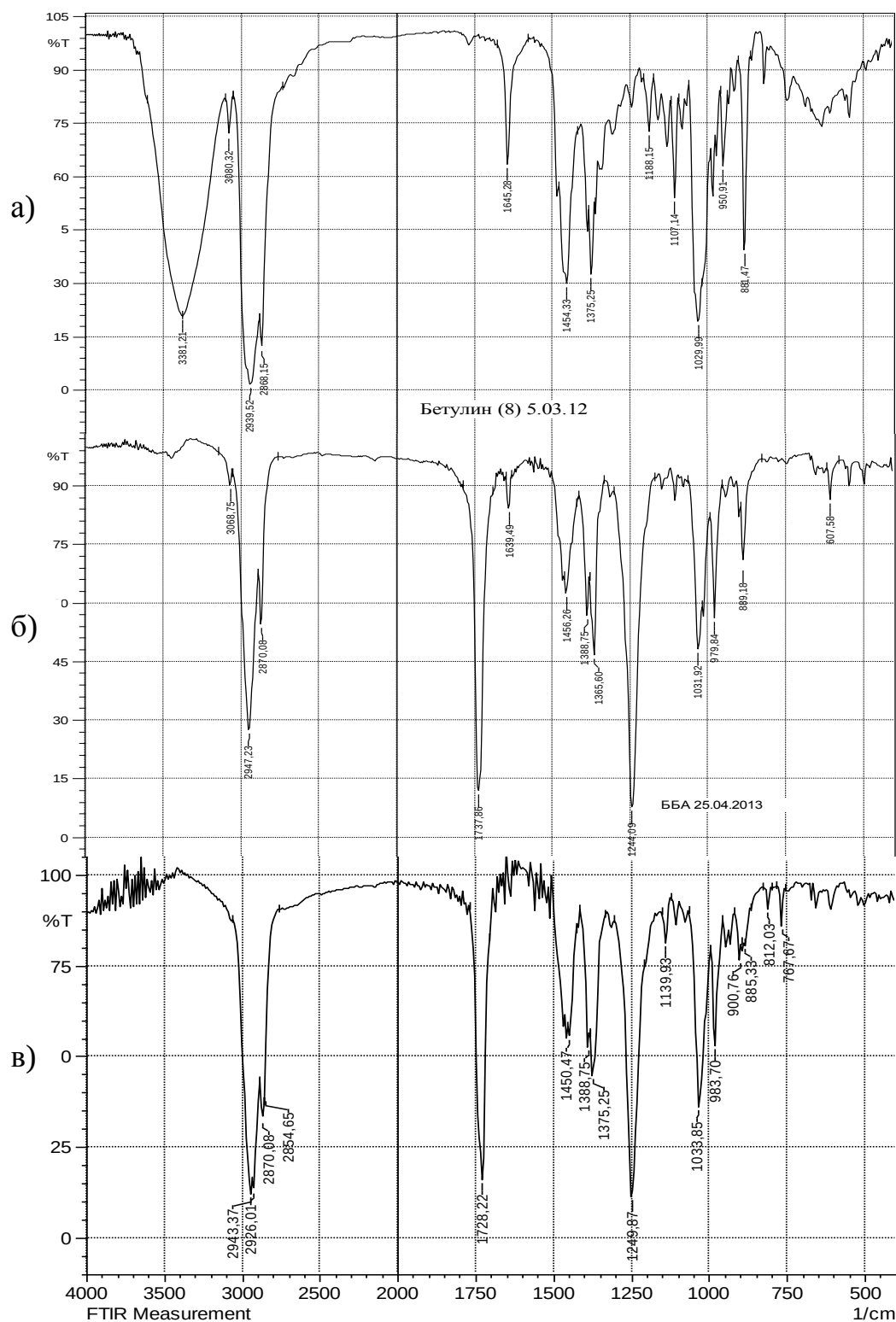


Рисунок 3.10. ИК-спектры бетулина (а) и диацетата, полученного по методу А.Н. Кислицына (б) и В.А. Левданского (в)

На рисунке 3.11 приведен фрагмент ^{13}C -ЯМР спектра диацетата бетулина, полученного по методу А.Н. Кислицына. Пики на полученном спектре соответствуют теоретическим данным (Таблица 3.11).

Таблица 3.11.Характеристика полного спектра ЯМР ^{13}C диацетата бетулина, (δ , м.д.)

	[53] CDCl_3	Наши результаты DMSO-d_6		[53] CDCl_3	Наши результаты DMSO-d_6
C25	15.92	15.86	C13	37.32	37.06
C26	16.27	16.46	C4	37.55	37.40
C6	17.94	17.77	C1	38.16	37.81
C29	18.89	18.81	C8	40.66	40.46
C11	20.58	20.33	C14	42.45	42.29
CH_3Ac	20.77	20.78	C17	46.08	46.06
CH_3Ac	21.04	21.01	C19	47.47	47.10
C2	23.46	23.43	C18	48.54	48.21
C12	24.92	24.74	C9	50.05	49.54
C15	26.83	26.68	C5	55.15	54.64
C23	27.71	27.70	C28	62.50	61.56
C16	29.35	29.03	C3	80.61	79.95
C21	29.52	29.27	C30	109.69	110.01
C7	33.91	33.61	C20	149.80	149.84
C22	34.32	34.09	COAc	170.63	170.66
C10	36.82	36.63	COAc	171.23	171.6

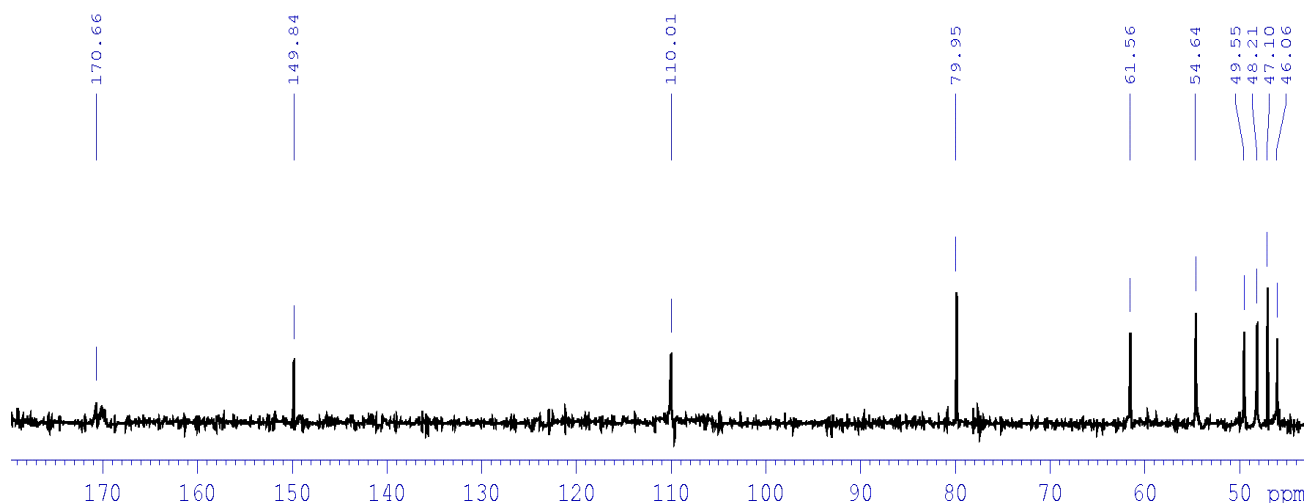


Рисунок 3.11. ^{13}C -ЯМР спектр диацетата бетулина, полученного по методу А.Н. Кислицына

3.3.3. Синтез дисукцината бетулина

Условия синтеза сукцинатов бетулина и их выход приведены в таблице 3.12.

Получение сукцинатов по методике С.А. Попова [31], в которой используется концентрат маточника после экстракции бересты березы, нами не рассматривалось по причине плохой воспроизводимости результатов и зависимости от качества используемого сырья.

Все методики предполагают использование в качестве этерифицирующего реагента янтарного ангидрида. В качестве мягкого акцептора протонов и компонента, структурирующего среду, использовали имидазол или пиридин, а в качестве среды использовали N-метилпирролидон, либо пиридин при различных температурах (Таблица 3.12).

Таблица 3.12.

Сравнительные условия синтеза и выход сукцинатов бетулина (результаты лаборатории НижГМА)

Источник	Glinski J. [86]		Krasutsky P.A. [88]		Усовершенствованная методика по Красутскому		Флехтер О.Б. [51]
Реактивы	Бетулин: имидазол: янтарный ангидрид = 1:4:1,08	Бетулин: имидазол: янтарный ангидрид = 1:4:4	Бетулин: имидазол: янтарный ангидрид = 1:1,1:3	Бетулин: имидазол: янтарный ангидрид = 1:3,1:3	Бетулин: имидазол: янтарный ангидрид : 4-ДМАП**** = 1:2:3:2	Бетулин: имидазол: янтарный ангидрид : 4-ДМАП**** = 1:4:3:4	Бетулин: янтарный ангидрид
Среда	N-МПД*	N-МПД*	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂	пиридин
Температура, °С	Комн.	70	Комн.	Комн.	Комн.	Комн.	Кип.
Время, ч	48	20	24	12	24	12	15
Выход, %	92-95	73	73 (49±2, n=5****)	82 (90±3, n=5****)	70	80	92
Основной продукт	28-моно-сукцинат	3,28-ди-сукцинат	28-моно-сукцинат	3,28-ди-сукцинат	28-моно-сукцинат	3,28-ди-сукцинат	3,28-ди-сукцинат
Примеси **	Бетулин, дисукцинат	Бетулин, моно-сукцинат	Бетулин (0,1%***), дисукцинат (30%**)	Бетулин (0,1%***), моно-сукцинат (3-5%****)	Бетулин (0,1%), дисукцинат (30%)	Бетулин (0,1%), моносукцинат (5%)	Бетулин, моно-сукцинат

Примечания: *N-МПД – N-метилпирролидон; **Количественный состав примесей не установлен; *** - наши данные по выходу продукта, ****- 4-диметиламинопиридин.

Нами была выбрана методика получения сукцинатов по Красутскому, в соответствии с которой синтез проводился в следующих условиях: комнатная температура и использование в качестве среды дихлорметана. Общая схема реакции приведена на схеме 3.7.

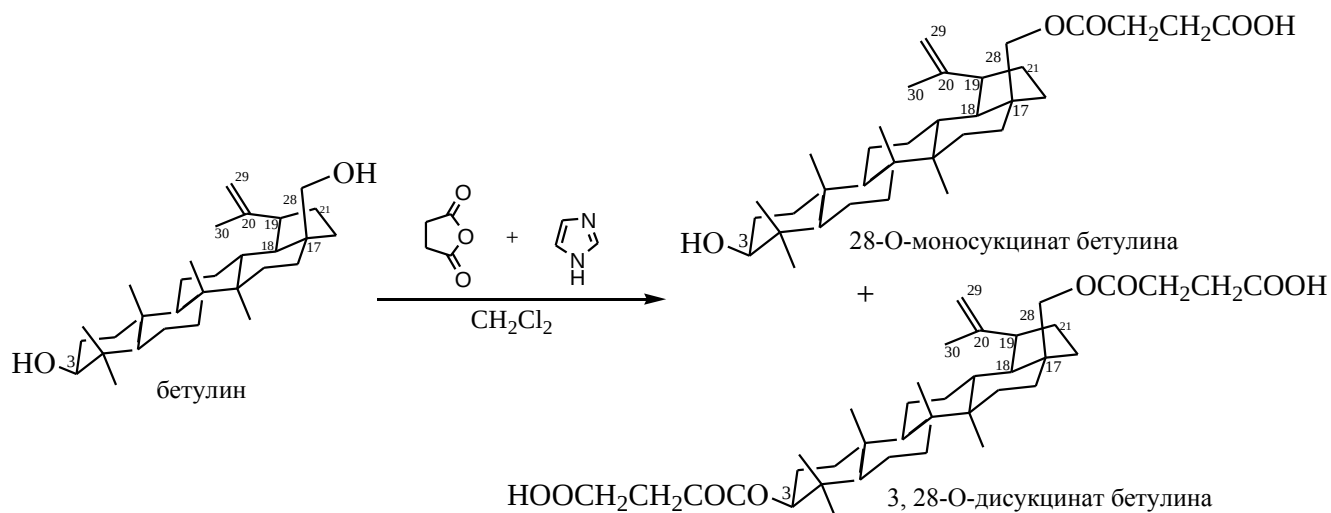


Схема 3.7. Получение моно- и дисукцинатов бетулина по Красутскому

Нами показано по данным ЯМР-спектров, что синтез моносукцината бетулина протекал неселективно с образованием смеси моно- и дисукцината в молярном соотношении 3:2 (Рисунок 3.12 а). В отличие от этого, дисукцинат образовывался с высоким выходом (Рисунок 3.12 б). В таблице 3.13 представлены сравнительные данные по основным химическим сдвигам на ^{13}C -ЯМР-спектрах, характерным для бетулина, моно- и дисукцината бетулина.

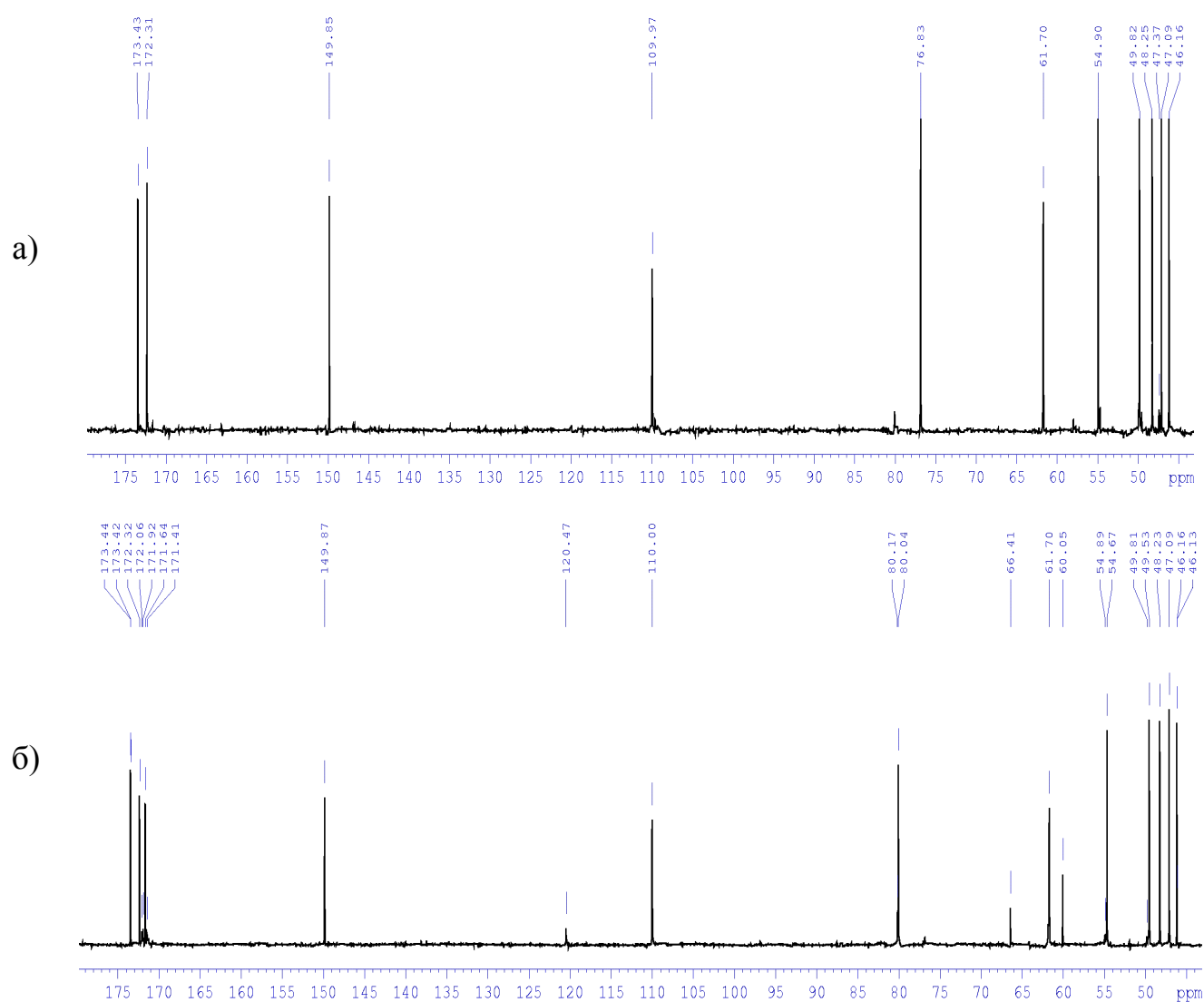


Рисунок 3.12. ^{13}C -ЯМР спектры моносукцината (а) и дисукцината (б) бетулина

Таблица 3.13.

Данные ^{13}C ЯМР – спектров моно- и дисукцината бетулина

	Химический сдвиг δ , м.д.				
	С-3	С-28	С-20	С-29	прочие
бетулин	79.1	60.6	150.4	109.4	—
моносукцинат бетулина	80.2	61.7	149.9	109.9	173.4 172.3
дисукцинат бетулина	80.2	61.7	149.9	110.0	173.4 172.3 171.6

На рисунке 3.13 представлены ИК-спектры исходного бетулина, моно- и дисукцинатов, данные которых сведены в таблицу 3.14.

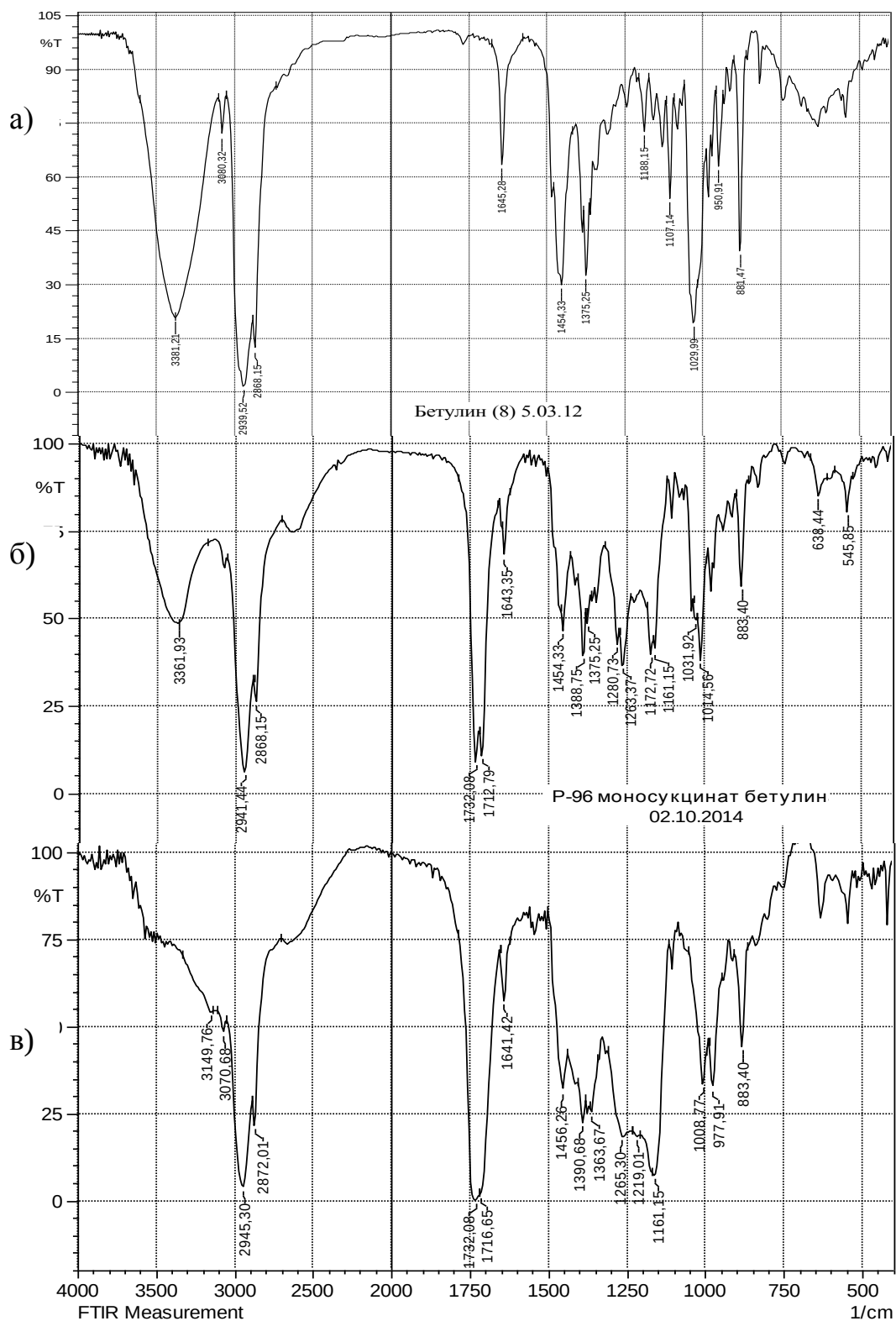


Рисунок 3.13. ИК-спектры бетулина (а), моносукцината (б) и дисукцината (в) бетулина

Таблица 3.14.

Данные ИК – спектров моно- и дисукцината бетулина

	Волновое число, ν см ⁻¹				
	3500–3100 $\nu_{\text{O-H}}$	1725–1700 $\nu_{\text{C=O}}$	1650–1630 $\nu_{\text{C=C}}$	1050–1000 $\nu_{\text{C-O}}$	1000–800 $\delta_{\text{C=CH}_2}$
бетулин	3381 ш. инт.	—	1645 узк. ср.	1030 ш. инт.	881 узк. инт.
моносукцинат бетулина	3362 ш. ср.	1732 1713 ш. инт.	1643 узк. ср.	1032 1014 ш. ср.	883 узк. инт.
дисукцинат бетулина	—	1732 ш. инт.	1641 узк. ср.	1009 978 узк. ср.	883 узк. инт.

Поскольку как моно-, так и дисукцинат бетулина проявляют высокую гипополидемическую активность [51], то можно предложить фармацевтическую субстанцию как в виде дисукцината, так и смеси сукцинатов.

Выводы по разделу 3.3.

1. Проведение синтеза бетулоновой кислоты в присутствии ГПК окислением бихроматом калия в водно-ацетоновой смеси позволяет получить целевой продукт с высоким выходом (не менее 95 %) при отсутствии неорганических примесей и минимальном содержании других примесей.

2. Усовершенствованной методикой является способ получения диацетата бетулина ацелированием уксусной кислотой, взамен токсичных уксусного ангидрида и пиридина, в среде этилацетата в присутствии паратолуолсульфокислоты при избирательном удалении воды из реакционной смеси (использование ловушки для воды и адсорбента - силикагеля) при кипячении.

3. Удобная методика получения дисукцината бетулина, позволяющей получить целевой продукт с более высоким выходом (не менее 80 %) и чистотой, представляет собой этерификацию бетулина янтарным ангидридом в присутствии имидазола и 4-ДМАП при комнатной температуре.

4. Синтез ацетата бетулина имеет следующие преимущества:

- а) и моно-, и диацетат бетулина обладают высокой и близкой между собой активностью;
- б) выход целевого продукта достигает 95%;
- в) в синтезе отсутствуют прекурсоры.

5. Диацетат бетулина является более подходящим для промышленного внедрения, чем дисукцинат бетулина, поэтому представляется целесообразным использовать в качестве фармацевтической субстанции смесь бетулоновой кислоты и диацетата бетулина.

3.4. Идентификация и количественное определение потенциальных фармацевтических субстанций

3.4.1. Методики идентификации и количественного определения бетулоновой кислоты и возможных примесей

Нами установлено, что основными примесями в продукте, полученном по вышеописанной методике, являются: бетулоновый альдегид, бетулин, остаточный растворитель.

Идентификация примесей

Для идентификации примеси бетулонового альдегида нами был синтезирован образец сравнения окислением бетулина системой $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$, импрегнированной на силикагеле в соответствии с методикой. [74]

Идентификацию неорганических примесей проводили методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС), а органических примесей методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). В этих условиях примеси элементов Cr, W, Mo не были обнаружены.

Близость химической структуры тритерпеновых соединений делает их разделение методом ТСХ очень сложным.

В таблице 3.15 приведены результаты по значениям R_f , полученные в различных условиях проведения ТСХ-анализа.

Нами проверены несколько методик ТСХ-анализа производных бетулина. В соответствии с известной методикой [78] используются пластины на основе силикагеля марки Merck GF254, а в качестве элюента гексан : этилацетат = 80:20 и дихлорметан : метанол = 98:2. Проявление осуществляют раствором сульфата церия 75 г и молибдата аммония 4г в 500 мл 10% серной кислоты. Эта методика позволяет проанализировать смесь бетулина, бетулинового и бетулонового альдегидов, бетулиновой и бетулоновой кислот. [78]

Таблица 3.15.

Характеристика изучаемых тритерпеноидов по данным ТСХ-анализа

БАВ	Сорбент	Элюент	Проявитель	R _f
Бетулоновый альдегид	Силикагель Merck GF254	гексан : этилацетат = 80:20	Ce(SO ₄) ₂ и (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O в 10% H ₂ SO ₄	0.80
Бетулиновый альдегид				0.50
Бетулон				0.37
Бетулин				0.28
Бетулиновый альдегид		CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH = 98:2		0.35
Бетулиновая кислота				0.31

Для анализа нами использовалось проявление ТСХ-пластин парами йода. В таблице 3.13 приведены сопоставительные результаты по ТСХ анализу в условиях методики [78] с использованием различных проявителей. Показано, что независимо от проявителя величины R_f для данной системы элюентов были близки. Следовательно, условия анализа по методике [78] могут быть использованы для идентификации примесей как в ходе мониторинга реакций окисления, так и продукта.

Альтернативной методикой ТСХ-анализа является методика авторов [80], в соответствии с которой используют алюминиевые пластинки 10 см х 20 см, покрытые слоем силикагеля (0,2 мм) 60F254. Образцы растворяют в метаноле и наносят пробу вручную полосами по 10 мм, отступая от нижнего края 10 мм. В качестве подвижной фазы используют н-гексан : этилацетат = 2:1. Проявляют с помощью 0,2% Ce(SO₄)₂ в 0,1 М H₂SO₄ (10 мин, 120°C). [80] Нами в экспериментах по описанной методике использован проявитель – пары йода, при этом полученные значения R_f для изучаемых тритерпеноидов были близки: 0,47 для бетулина; 0,50 для бетулиновой кислоты; 0,75 для лупеола. В качестве эталона сравнения рекомендовано использовать β-ситостерола, для которого

значение R_f равно 0,56. Таким образом, методика [80] более предпочтительна для анализа бетулина, выделяемого из бересты березы, и его примеси - лупеола.

Для разделения исходного бетулина и бетулоновой кислоты удобна ТСХ-методика авторов [37], с более полярным элюентом. В соответствии с этой методикой, подготовку пробы осуществляют следующим образом: 50 мг исследуемого вещества растворяют в 10 мл метанола, из них 20 мкл наносят на ТСХ пластинку с силикагелем GF254 «Merck» (Durmstadt, Germany). В качестве элюента используют бензол - этилацетат - муравьиная кислота (36:12:5), проявляя пластины 4-метоксибензальдегидом в серной кислоте. [37] Нами был модифицирован состав элюента: гексан - этилацетат - муравьиная кислота (20:5:1), а в качестве проявителя были использованы пары йода. Показано, что в этих условиях достигалось лучшее разделение: R_f бетулина = 0,30, R_f бетулоновой кислоты = 0,50.

Наличие бетулонового альдегида как основной примеси в бетулоновой кислоте устанавливали по карбонильному числу, рассчитанному по реакции взаимодействия гидроксиламина солянокислого с карбонильными группами. (схема 3.8.)

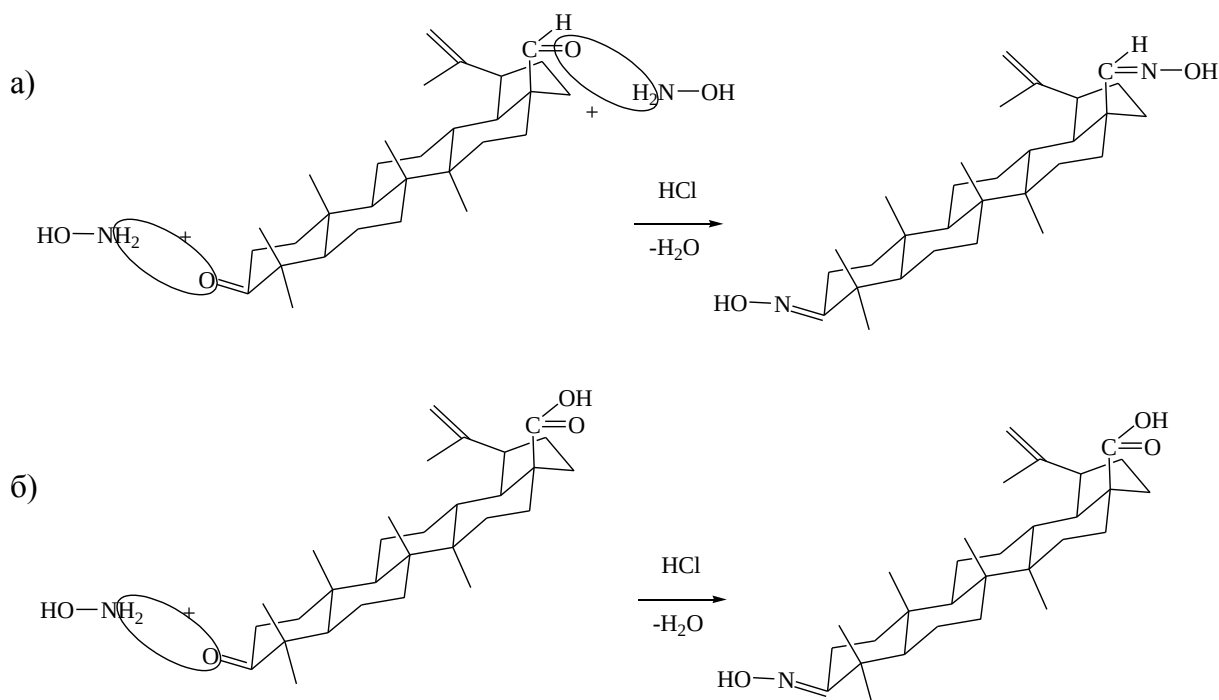


Схема 3.8. Предполагаемая схема реакции гидроксиламина солянокислого с бетулоновым альдегидом (а) и бетулоновой кислотой (б)

Использовали ацидиметрическое обратное титрование при параллельном проведении контрольного опыта. [1, 4]

Карбонильное число $\text{теор.} = 70$ для соединений с одной карбонильной группой (бетулоновая кислота); карбонильное число $\text{теор.} = 140$ для соединений с двумя карбонильными группами (бетулоновый альдегид).

Таким образом, рассчитанное карбонильное число должно быть не более 73,5 (примесь бетулонового альдегида не более 5%).

Идентификация бетулоновой кислоты

Циклопентанпергидрофенантроновый цикл в бетулоновой кислоте можно установить по появлению малинового окрашивания в реакции с ванилином. (Схема 3.9)

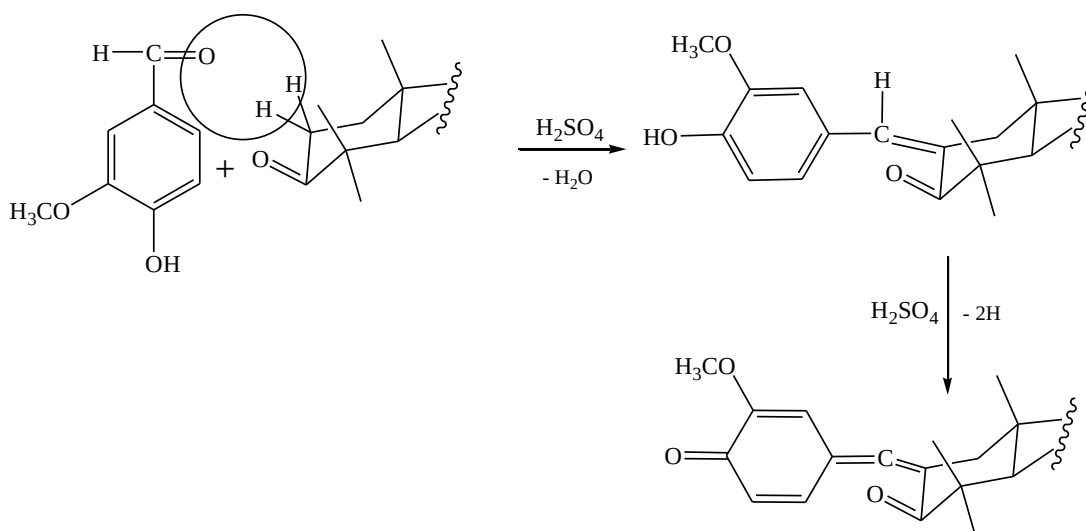


Схема 3.9. Предполагаемая схема реакции бетулоновой кислоты с ванилином

Идентификацию основного продукта проводили методами ^{13}C -ЯМР-, ^1H -ЯМР-, ИК-спектроскопии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Характеристики спектров представлены ниже (Таблицы 3.16, 3.17.).

Таблица 3.16

Характеристика полного спектра ЯМР ^{13}C , (CDCl_3 , δ , м.д.)

<i>C1</i>	39.6	<i>C2</i>	34.1	<i>C3</i>	216.5	<i>C4</i>	47.3	<i>C5</i>	55.0	<i>C6</i>	19.6
<i>C7</i>	33.6	<i>C8</i>	40.7	<i>C9</i>	49.9	<i>C10</i>	36.9	<i>C11</i>	21.4	<i>C12</i>	25.5
<i>C13</i>	38.5	<i>C14</i>	42.5	<i>C15</i>	30.5	<i>C16</i>	32.1	<i>C17</i>	56.2	<i>C18</i>	49.2
<i>C19</i>	46.8	<i>C20</i>	150.3	<i>C21</i>	29.7	<i>C22</i>	37.0	<i>C23</i>	26.6	<i>C24</i>	21.0
<i>C25</i>	16.0	<i>C26</i>	15.8	<i>C27</i>	14.6	<i>C28</i>	177.3	<i>C29</i>	109.5	<i>C30</i>	19.4

Таблица 3.17

Характеристика полного спектра ЯМР ^1H , (CDCl_3 , δ , м.д.)

3H, 24-CH ₃	0.80 c	комплекс, CH ₂ , CH	1.02 – 1.95
3H, 23-CH ₃	0.84 c	3H, 30-CH ₃	1.64 c
3H, 27-CH ₃	0.98 c	1H, 19-H	2.97 м
3H, 25-CH ₃	1.00 c	1H, 29-H	4.57 c
3H, 26-CH ₃	1.02 c	1H, 29-H	4.70 c

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C соответствовали спектрам стандартов.

Подлинность также устанавливали по таким физико-химическим характеристикам, как температура плавления и поляризуемость: **Т. пл.** 250 – 252 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +12,2^\circ$ (с 0.09, CHCl_3), которые совпадали с литературными данными.

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

На рисунке 3.14 (а) приведена хроматограмма, полученная при количественном определении бетулоновой кислоты. Время удерживания пика 6,65 мин соответствует бетулоновой кислоте.

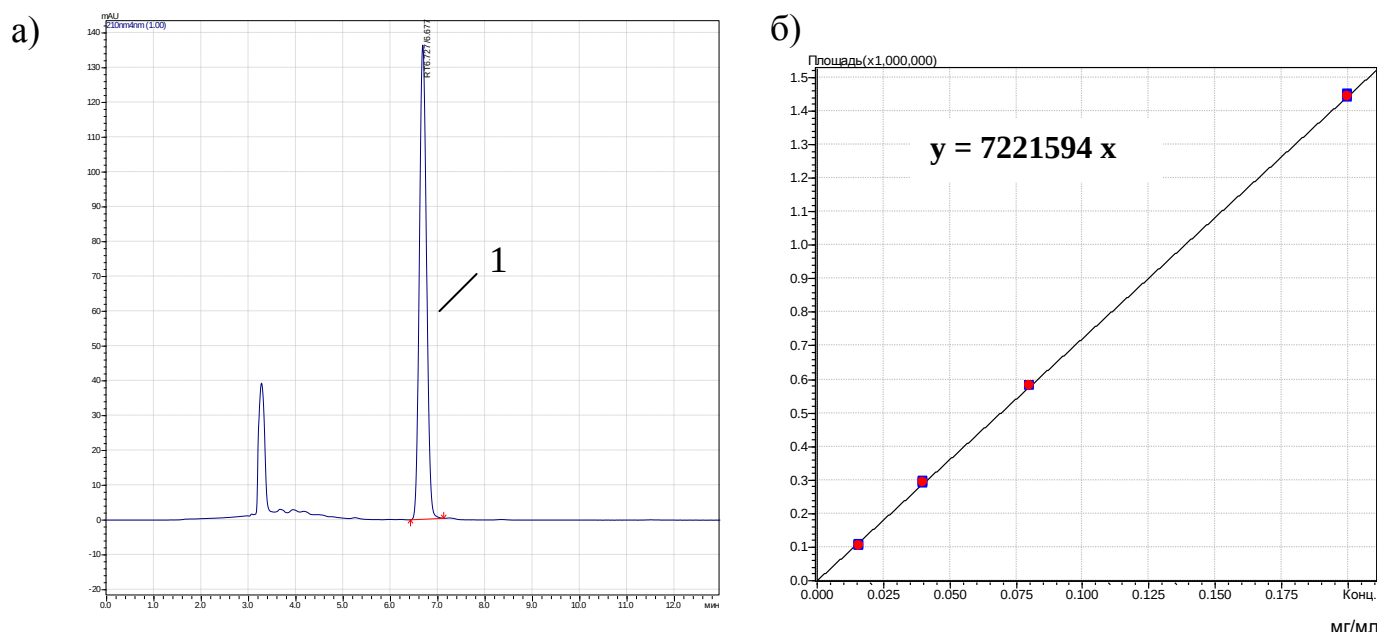


Рисунок 3.14. ВЭЖ-хроматограмма бетулоновой кислоты (а)

и градуировочный график (б). Время удерживания – 6,65 мин.

Время удерживания 3,23 мин соответствует примеси в ацетонитриле.

Количественное определение бетулоновой кислоты

Количественное определение проводили методом ВЭЖХ-анализа. Для этого по растворам образцов сравнения, концентрация которых соответствовала 0,016; 0,040; 0,080 и 0,200 мг/мл, был построен градуировочный график (Рисунок 3.14 (б)). Рассчитанное по площади пика содержание испытуемой субстанции бетулоновой кислоты в растворе с концентрацией 0,05 мг/мл составило 0,04975 мг/мл, что соответствовало 99,5 % чистоты.

Количественное определение остаточных органических растворителей

проводили методом ГЖХ. Их содержание соответствовало требованиям ОФС «Остаточные органические растворители» ГФ XII.

3.4.2. Методики установления подлинности и количественного определения фармацевтической субстанции – диацетата бетулина

Основными показателями качества субстанции диацетата бетулина являются: идентификация примесей, остаточные органические растворители и идентификация и количественное определение диацетата бетулина.

Идентификация примесей

Основными примесями в субстанции диацетата бетулина являются бетулин и моноацетат бетулина. Количественное содержание определяли методом ВЭЖХ. Вычисленное значение не превышало 0,5 % для бетулина и 2-5 % для моноацетата.

Идентификация диацетата бетулина

Идентификацию основного продукта проводили методами ^{13}C -ЯМР-, ИК-спектроскопии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Характеристики спектров были представлены ранее. (Таблица 3.11, Рисунки 3.9, 3.10, 3.11.)

Спектр ^{13}C ЯМР соответствовал спектру образца сравнения.

ИК-спектр (KBr , cm^{-1}): 3068,75 ($=\text{C}-\text{H}$); 2947,23; 2870,08 ($\text{C}-\text{H}$); 1737,86 ($\text{C}=\text{O}$); 1639,49 ($\text{C}=\text{C}$); 1456,26; 1388,75; 1365,60 ($\text{C}-\text{C}$); 1244,09; 1149,57; 1105,21 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) и **Т. пл.** 221 – 223 $^{\circ}\text{C}$ совпадали с литературными данными [20].

Диацетат бетулина реагирует с ванилином, образуя малиновое окрашивание (Схема 3.10).

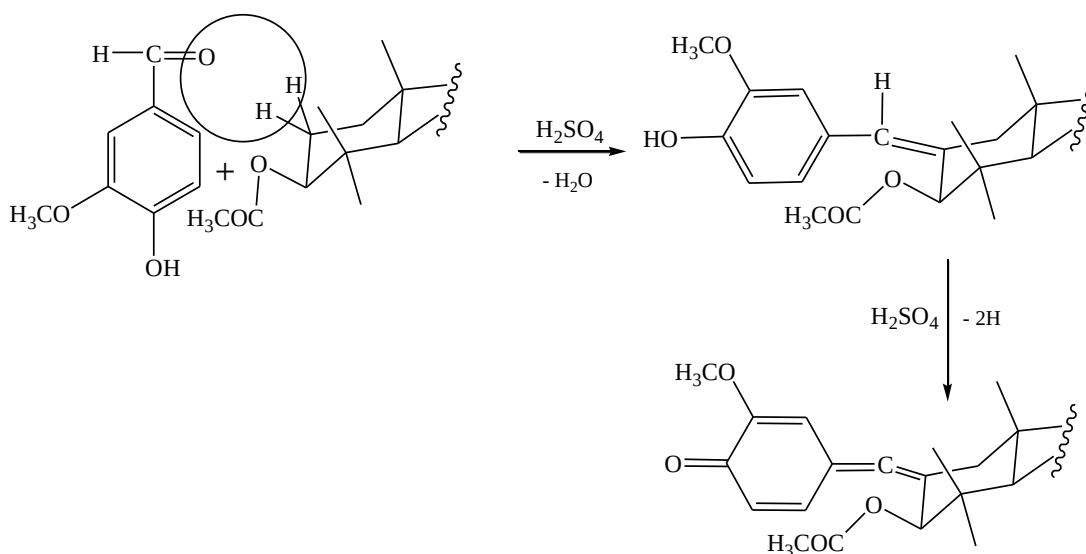


Схема 3.10. Предполагаемая схема реакции диацетата бетулина с ванилином на стероидный (циклопентанпергидрофенантреновый) цикл

Время удерживания пика на хроматограмме, полученной методом ВЭЖХ, составило 20,79 мин (Рисунок 3.9), что совпадает с временем удерживания образца сравнения диацетата бетулина.

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

Количественное определение диацетата бетулина

Для определения количественного содержания диацетата бетулина был построен градуировочный график по растворам образцов сравнения диацетата бетулина по следующим концентрациям: 0,025; 0,05 и 0,075 мг/мл (Рисунок 3.15).

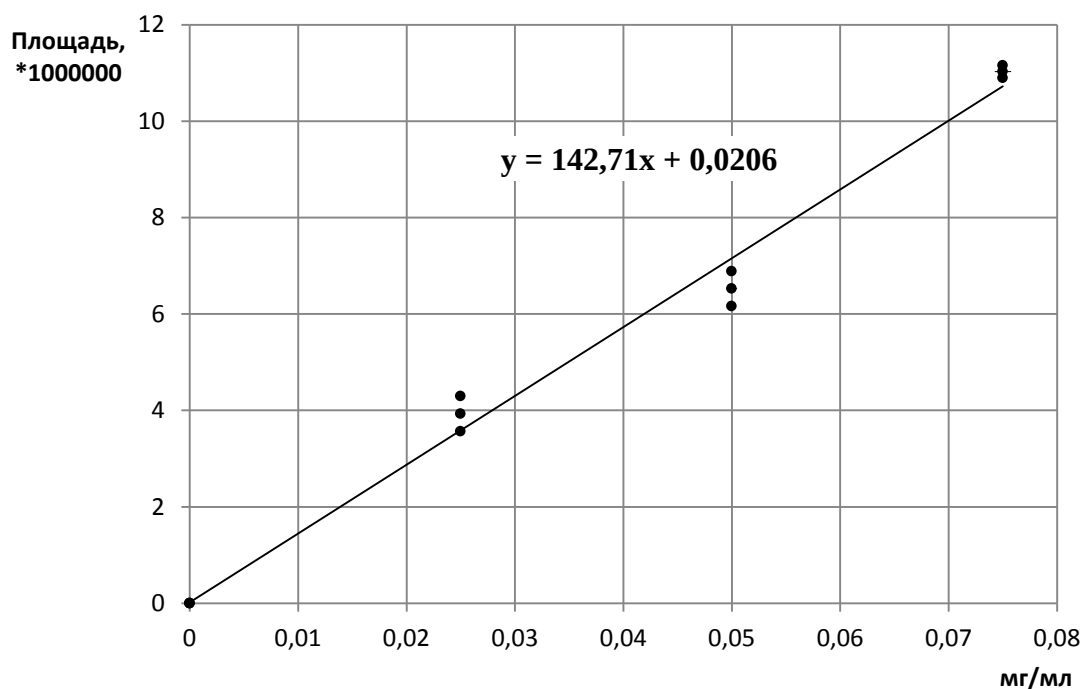


Рисунок 3.15. Градуировочный график для количественного определения диацетата бетулина

Испытуемый образец готовили в концентрации 0,05 мг/мл. Вычисленное значение составило 0,049 мг/мл, что соответствовало 98,3 %.

3.4.3. Методики идентификации и количественного определения дисукцината бетулина

Основными примесями синтеза дисукцината бетулина являются моносукцинат бетулина и непрореагировавший бетулин.

К реакциям идентификации эфиров бетулина относится реакция на циклопентанпергидрофенантреновый цикл с ванилином (схема 3.11.), а также для дисукцината бетулина характерны реакции на остаток янтарной кислоты после гидролиза с гидроксидом меди (II), нитратом свинца (II). (схема 3.12.)

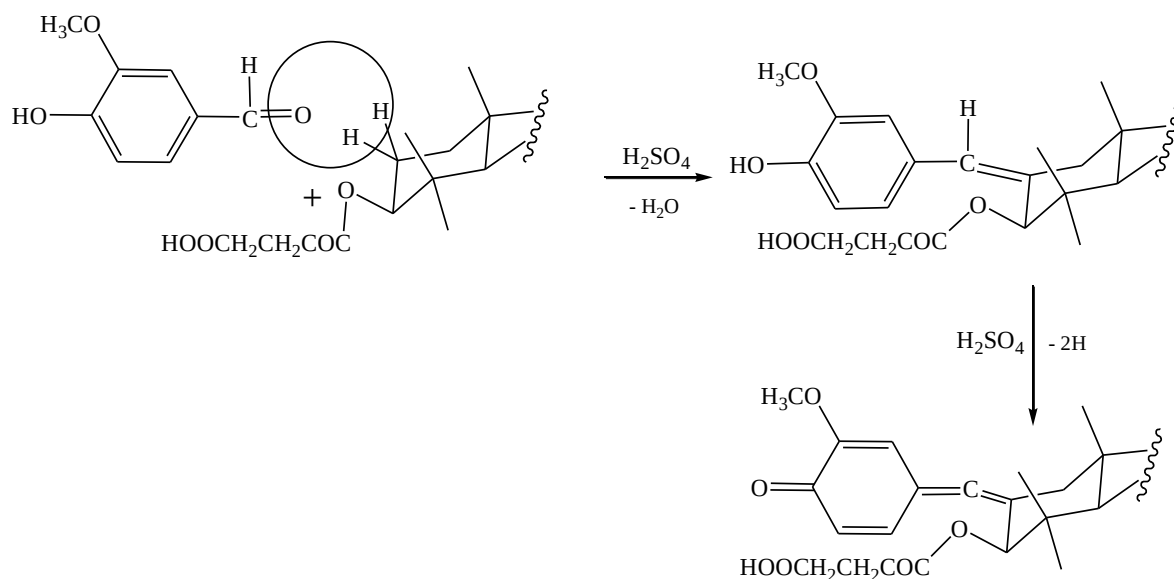


Схема 3.11. Общая схема реакции дисукцината бетулина с ванилином

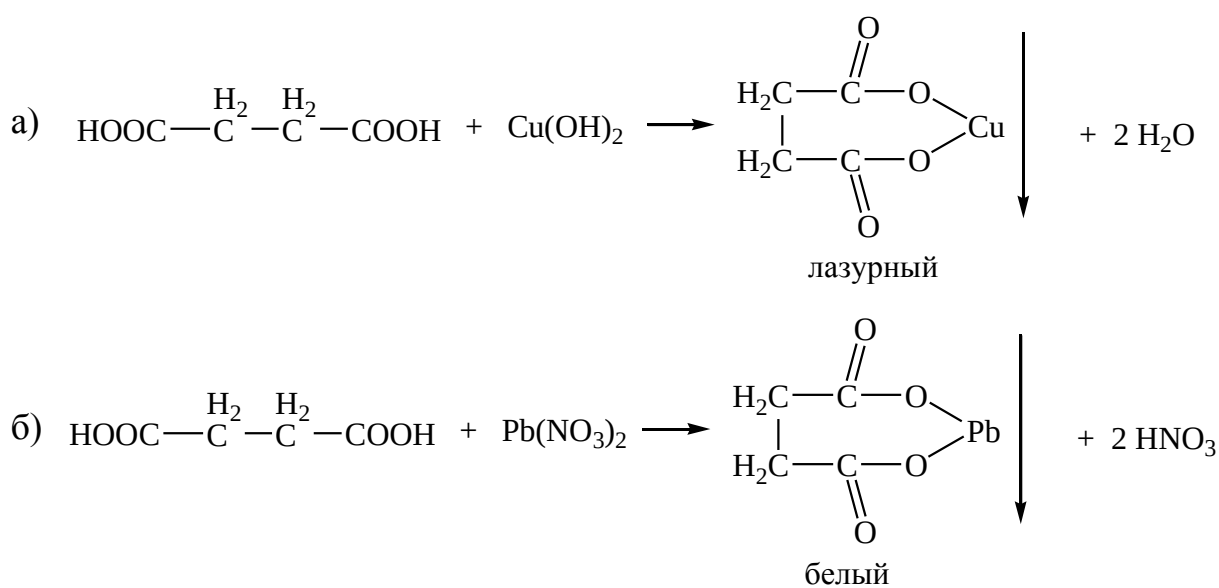
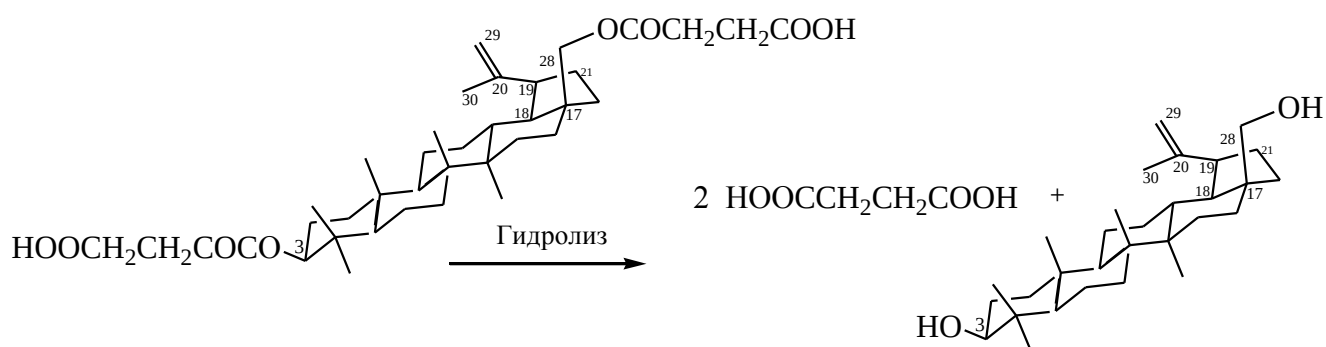


Схема 3.12. Реакции идентификации остатка янтарной кислоты после гидролиза дисукцината бетулина

^{13}C -ЯМР- и ИК-спектры полученных продуктов соответствовали спектрам образцов сравнения и совпадали с литературными данными [88].

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

Количественное определение дисукцината бетулина проводили методом ИК-спектроскопии. Расчет вели по градуировочному графику, построенному по интенсивности полосы поглощения карбонильной группы образцов сравнения, концентрация которых соответствовала от 1 до 4 мг на 100 мг таблетки с KBr. (Рисунок 3.16)

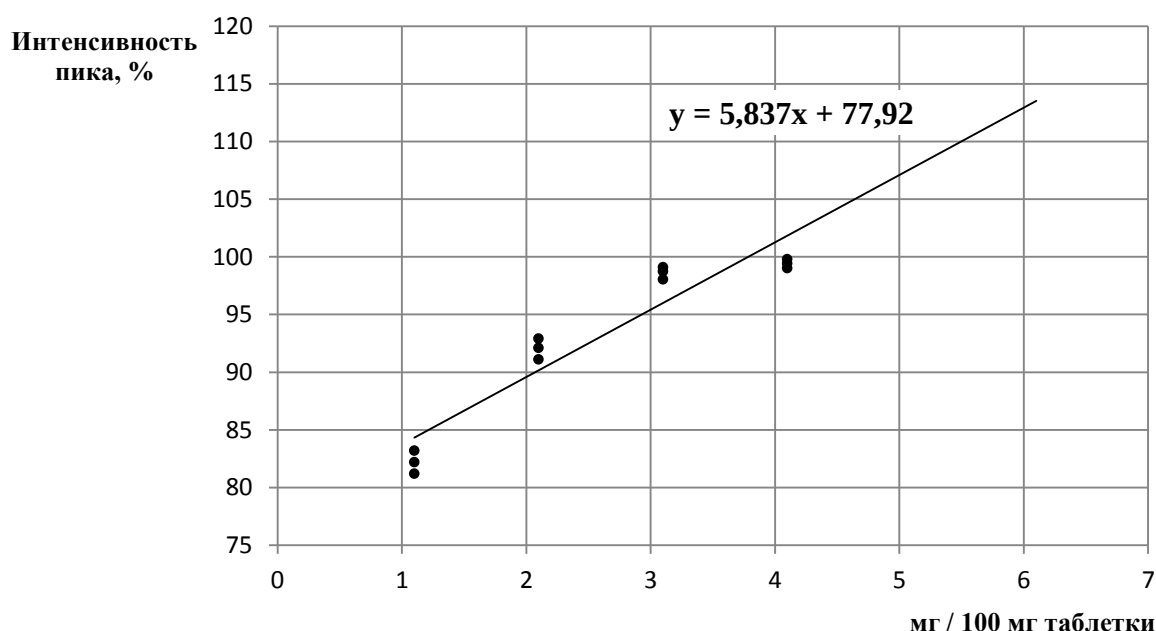


Рисунок 3.16. Градуировочный график для количественного определения дисукцината бетулина

3 мг анализируемого образца, перекристаллизованного из этанола, растирали в 97 мг KBr для образования таблетки массой 100 мг. По градуировочному графику нашли содержание дисукцината бетулина 2,76 мг, что соответствует 92 % чистоты.

Выводы по разделу 3.4.

1. Предложены методики идентификации (ЯМР, ВЭЖХ, $T_{пл.}$) и разработана методика количественного определения (ВЭЖХ) бетулоновой кислоты как потенциальной фармацевтической субстанции.
2. Разработаны методики идентификации и количественного определения примеси бетулонового альдегида в целевом продукте – бетулоновой кислоте (ТСХ, ВЭЖХ, реакция с гидроксиламином) и лупеола (ТСХ, ВЭЖХ) в исходном бетулине.
3. Проведен анализ диацетата бетулина методами ВЭЖХ и ЯМР как потенциальной фармацевтической субстанции.
4. Разработаны методики идентификации и количественного определения дисукцината бетулина (ИК-спектроскопия) как потенциальной фармацевтической субстанции.

ГЛАВА 4. НОВЫЕ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ЭФИРОВ БЕТУЛИНА И БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ В МАСЛЕ СЕМЯН ТЫКВЫ

4.1. Обоснование состава препарата, обладающего гиполипидемическим и гипохолестеринемическим действием

Основными действующими веществами гиполипидемического препарата были выбраны бетулоновая кислота или диацетат бетулина, либо их эквимольная смесь. Выбор этих действующих веществ обусловлен как простотой препаративной методики их получения и выделения, надежной идентификацией примесей и отсутствием токсичности, так и их высокой гиполипидемической и гипохолестеринемической активностью. В таблице 4.1 приведены основные преимущества и недостатки синтезов производных бетулина.

Бетулин и его производные, в том числе бетулоновая кислота и эфиры бетулина, плохо растворяются как в воде, так и в липофильных средах. Для обеспечения хорошей биодоступности и биоусвояемости изучаемых соединений – бетулоновой кислоты и эфира бетулина – диацетата бетулина, при пероральном приеме разрабатываемого фитопрепарата нами предложено использовать масло семян тыквы. Известны свойства МСТ снижать уровень холестерина и ЛПНП, что было использовано в ряде гиполипидемических БАД на основе МСТ. В настоящее время появилось описание вновь выявленных эффектов МСТ, таких как антикоагуляционный эффект, снижение сахара, гепатопротекторное действие. [100, 107]

Таблица 4.1.

Достоинства и недостатки получения производных бетулина

	Достоинства	Недостатки
Фосфат бетулина	Высокая гидрофильность	- Неустойчивость дифосфодихлорида - Высокое содержание примесей - Легкость образования труднорастворимых пирофосфатов - Длительность синтеза (24 ч) - Возможность образования сольватов
Дисукцинат бетулина	- Возможность перевода в более растворимую в воде динатриевую соль - Высокая липофильность	- Сложность выделения сырца - Малый выход чистого продукта за счет трудоемкой очистки - Высокое содержание примеси моносукцината бетулина - Длительность синтеза (12 ч) - Возможность образования сольватов
Бетулоновая кислота	- Длительность синтеза (1,5 ч) - Простота выделения сырца - Высокая липофильность	Использование соединений Cr^{VI}
Диацетат бетулина	- Простота синтеза - Длительность синтеза (4 ч) - Высокий выход продукта - Минимальное количество примесей	Возможность образования гидратов

Фармакологический эффект воздействия МСТ, как полагают, обусловлен 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 β -ситостерол.

Мы полагаем, что улучшение гиполипидемического и гипохолестеринемического действия обусловлено высоким содержанием фитостеролов, основным из которых является β -ситостерол, в масле семян тыквы, концентрация которых в свободном или связанном с белковыми веществами состояниях в виде сложных комплексов равна 105-200 мг%. С химической точки зрения фитостеролы представляют собой 4-дез метильные стеролы и станола, содержащие в положении 3 гидроксильные группы, и имеют близкое структурное

сходство с холестеролом. Функции фитостеролов и холестерина аналогичны в растительных и животных клетках, они обеспечивают структурную целостность клеточных мембран, интегрируясь в них, однако, фитостеролы не синтезируются в животном организме и попадают в него только с пищей. Основное структурное различие между холестеролом и растительными стеролами имеется в боковой цепи: у растительных стеролов имеется дополнительно метильная группа (кампестерол) или этильная группа (ситостерол), или двойная связь (стигмастерол).

Гипохолестеринемическое действие β -ситостерола объясняется тем, что он действует по принципу антиметаболитов, благодаря подобию химической структуры холестерина, вытесняя его при взаимодействии с ЛПНП в плазме. Другим механизмом гипохолестеринемического действия является образование достаточно стабильных комплексов β -ситостерола с холестеролом, затрудняя всасывание их из желудочно-кишечного тракта [38].

Кроме того, фитостеролы (кампестерол, β -ситостерол и их глюкопиранозиды) в МСТ по отношению к изучаемым соединениям: бетулоновой кислоте и диацетату бетулина, способны выполнять роль вектора доставки в лекарственной форме.

Бетулоновая кислота и диацетат бетулина, как тритерпеноиды, имеют структуру близкую к фитостеролам и могут быть также колоидно растворимы в МСТ, как и фитостеролы. Следовательно, МСТ является идеальной средой для обеспечения биодоступности производных бетулина.

На воздухе в МСТ быстро теряет свои ценные свойства: происходит изменение жирно-кислотного состава масла в сторону уменьшения доли ненасыщенных жирных кислот, уменьшение концентрации каротиноидов и токолов. Нами предложено для стабилизации МСТ использовать монотерпеновый спирт – тимол.

Тимол проявляет сильные антиоксидантные свойства в среде масла за счет ингибирования реакции перекисного окисления липидов, прерывая цепь свободно-радикальных реакций, что обуславливает его способность обеспечить

высокую стабильность природных антиоксидантов и ненасыщенных жирных кислот в МСТ [104]. Также доказана его положительная роль в обеспечении гиполипидемического действия в снижении ЛПНП [99].

Показано, что концентрация каротиноидов МСТ в присутствии тимола практически не изменялась в условиях ускоренного старения при температуре 40°C. (Таблица 4.2) Исходное МСТ содержит 6 мг% α -токоферола, около 50 мг% смеси γ -токоферола и γ -токотриенола, 105-150 мг% β -ситостерола.

Таблица 4.2.

Изменение состава масла семян тыквы при хранении на воздухе при 25°C

	Сумма токолов, 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 бетулоновую кислоту и/или ацетат бетулина в масле семян тыквы, при следующем соотношении компонентов, масс. %:

бетулоновая кислота и/или

ацетат бетулина 0,1 – 1,0;

тимол 0,05 – 1,0;

масло семян тыквы 98 – 99,85.

Нами изучены свойства компонентов препарата в различных концентрационных интервалах. Показано, что эффективность препарата при концентрации тритерпеноидов меньше 0,1% низка. При концентрации тритерпеноидов в интервале 1,0-3,0 % гиполипидемическое действие не изменялось.

Установлено, что компоненты масла семян тыквы остаются стабильными по отношению к процессам окисления каротиноидов и токолов [106] при концентрации тимола 0,05 %. Введение тимола в концентрациях больше 1,0 % (больше 2,0 мг) нецелесообразно вследствие раздражающего действия на слизистую оболочку желудка при этих концентрациях.

Соотношение бетулоновой кислоты и эфира бетулина от 1:9 до 9:1. Предложенный состав может быть использован для изготовления различных лекарственных форм на мазевой основе, в частности, мази, кремы, суппозитории, а также капсул.

Бетулоновая кислота и диацетат бетулина также относятся к фитостеролам, поскольку их получают из растительного сырья – бетулина, содержащегося в бересте березы, а также в некоторых других растениях. Наличие кето- или сложноэфирной групп в C_3 положении молекулы бетулина придает молекулам этих соединений дополнительные кортикостероидные свойства.

Другим фактором, способствующим гиполипидемическому и гипохолестеринемическому эффектам, является высокое содержание ненасыщенных кислот в масле семян тыквы (до 80 %), которое в сочетании с фитостеролами открывает широкие возможности для лечения липид-ассоциированных заболеваний.

В качестве актуального пути решения проблемы доставки действующего вещества к цели и недостаточной растворимости производных бетулина в МСТ можно рассмотреть механохимический метод получения твердых дисперсных систем, заключающийся в разрушении первоначальной структуры бетулина в кристаллах за счет ослабления гидрофобного взаимодействия и водородных связей, появления большого количества дефектов в нанокристаллах. [18] В таких системах мелкие частицы (вплоть до отдельных молекул) лекарственного вещества распределены в матрице вспомогательного вещества. Диспергирование в матрице носителя, повышение смачиваемости лекарственного вещества в присутствии полимера, аморфизация и образование молекулярных комплексов «лекарственное вещество – носитель» приводит к увеличению растворимости. Скорость выделения лекарственного вещества из твердой дисперсной системы повышается в десятки раз.

Таким образом, механическое перетирание субстанций производных бетулина с маслом семян тыквы увеличит не только их растворимость, но и биодоступность, что позволит уменьшить дозировку препарата.

Способ приготовления предлагаемого фитопрепарата: берут 0,1-1,0 г бетулоновой кислоты или диацетата бетулина (или их смесь) и 0,05-0,1 г тимолы перетирают в ступке, затем добавляют масло семян тыквы до 100 г. После перемешивания полученную смесь обрабатывают ультразвуком для полного растворения твердых компонентов исследуемого фитопрепарата.

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

В эксперименте на белых нелинейных крысах нами были исследованы гиполипидемическое и гипохолестеринемическое действия препаратов с бетулоновой кислотой (БК), диацетатом бетулина (ДАБ) и их смесью («Бетулитим») в масле семян тыквы.

Экспериментальную гиперхолестеринемию вызывали внутрибрюшинным введением Твина-80. Анализировали кровь, полученную от шести групп животных:

1. Интактные животные – не подвергались какому-либо воздействию;
2. Контроль 1 – крысы с гиперхолестеринемией, не получающие лечение;
3. Контроль 2 – группа крыс с гиперхолестеринемией, получающие лечение маслом расторопши;
4. Препарат с ДАБ - группа крыс с гиперхолестеринемией, получающие лечение препаратом диацетата бетулина в масле семян тыквы;
5. Препарат с БК - группа крыс с гиперхолестеринемией, получающие лечение препаратом с бетулоновой кислотой в МСТ;
6. Препарат с БК+ДАБ - группа крыс с гиперхолестеринемией, получающие лечение препаратом «Бетулитим», содержащим смесь бетулоновой кислоты и диацетата бетулина в МСТ.

В качестве сравнения в группе Контроль 2 животным вводили масло расторопши. Выбор масла расторопши обусловлен близким химическим составом

биологически активных веществ (ненасыщенные жирные кислоты, каротиноиды, токолы, фитостеролы), а также богатое тритерпеновыми кислотами. Кроме того, за счет высокой концентрации флаволигнанов (например, силибина) масло расторопши проявляет высокие гиполипидемические и гепатопротекторные свойства.

Кровь от декапитированных крыс собирали в пробирки с гепарином и центрифугировали. Затем определяли оптическую плотность полученной сыворотки с использованием специальных реагентов наборов Vital и рассчитывали содержание холестерина и триглицеридов по формулам:

$$C_{\text{ХС.}} = A_{\text{оп.}} / A_{\text{к.}} \times 5,17 \text{ ммоль/л}, \quad (4.1)$$

где $A_{\text{оп.}}$ – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотн.;

$A_{\text{к.}}$ - оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотн.;

5,17 ммоль/л – концентрация холестерина в калибраторе.

$$C_{\text{ТГ.}} = A_{\text{оп.}} / A_{\text{к.}} \times 2,85 \text{ ммоль/л} - 0,11 \text{ ммоль/л}, \quad (4.2)$$

где $A_{\text{оп.}}$ – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотн.;

$A_{\text{к.}}$ - оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотн.;

2,85 ммоль/л – концентрация триглицеридов в калибраторе;

0,11 ммоль/л – поправка на содержание свободного глицерина в сыворотке крови.

В таблицах 4.3 и 4.4 приведены результаты исследования гипохолестеринемической и гиполипидемической активности предлагаемых препаратов. (Рисунки 4.1 и 4.2)

Таблица 4.3.

Влияние препаратов производных бетулина в МСТ на содержание холестерина в крови животных

Группа	Содержание холестерина, ммоль/л		Изменение, %
	Твин-80	Твин-80 + препарат	
Интактные, n=5	3.10±0.67	-	-
Контроль 1, n=5	12.18±0.64	-	+292.9±20.6
Контроль 2 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

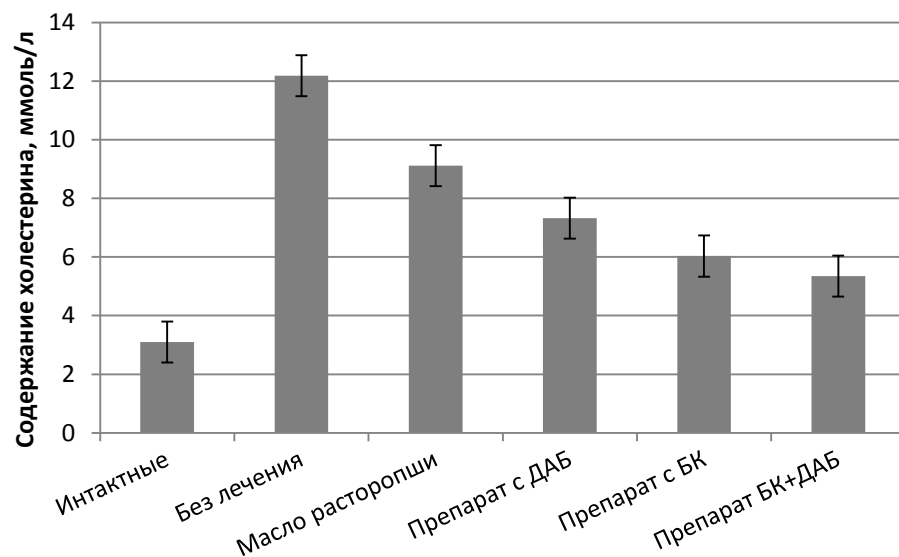


Рисунок 4.1. Влияние препаратов производных бетулина в МСТ на содержание холестерина в крови животных

Таблица 4.4.

Влияние препаратов производных бетулина в МСТ на содержание триглицеридов в крови животных

Группа	Содержание триглицеридов, ммоль/л		Изменение, %
	Твин-80	Твин-80 + препарат	
Интактные, n=5	0.64±0.15	-	-
Контроль 1, n=5	0.88±0.15	-	+37.3±18.8
Контроль 2 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

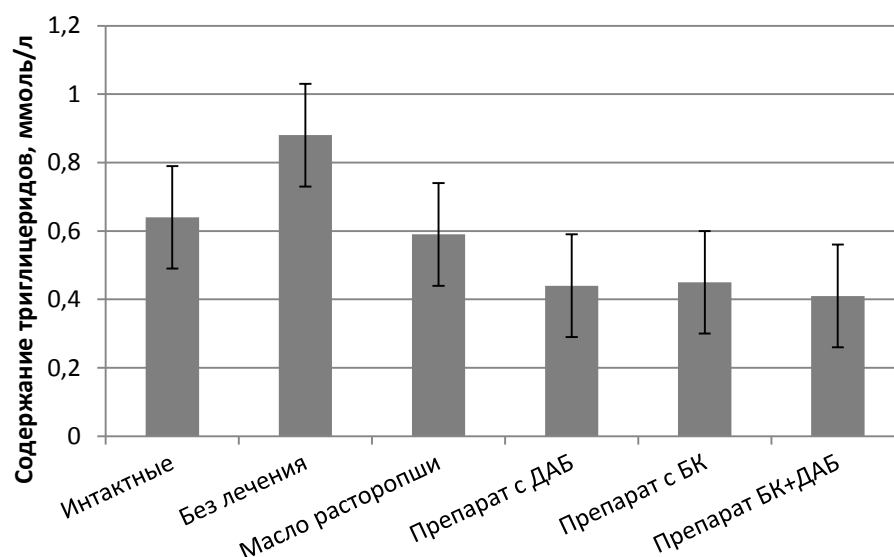


Рисунок 4.2. Влияние препаратов производных бетулина в МСТ на содержание триглицеридов в крови животных

Как показали опыты (Таблицы 4.3, 4.4), в результате введения Твина-80 у крыс контрольной группы (Контроль 1) 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 препаратов во всех случаях отмечалось снижение в крови крыс концентрации как

холестерина, так и триглицеридов. 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).

Выводы по разделу 4.1.

1. Разработан состав препарата гиполипидемического и гипохолестеринемического действия на основе масла семян тыквы, включающий производные бетулина – бетулоновая кислота и диацетат бетулина.

2. В эксперименте на крысах при внутрибрюшинном введении Твина-80 доказано гипохолестеринемическое и гиполипидемическое действие разработанного препарата в форме капсул.

Разработанный гиполипидемический препарат может быть использован для лечения и профилактики широкого круга заболеваний нарушения обмена веществ, в том числе липид-ассоциированных заболеваний (сахарный диабет, атеросклероз, варикоз, гепатоз).

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 фосформолибденовой 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 HCl : 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-, ^1H -ЯМР- и ^{13}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 и перспективы дальнейшей разработки темы

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 фитопрепаратов в виде различных лекарственных форм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бауер, К. Анализ органических соединений [Текст] / К. Бауер; под ред. А.Д. Петрова. – Москва : Изд-во иностр. лит – ры, 1953. – 488 с.
2. Бубнова, М.Г. Лечение атерогенных гипер- и дислипидемий при сердечно-сосудистых заболеваниях [Текст] / М.Г. Бубнова, Д.М. Аронов // Медицинский совет. 2010. № 1-2. С. 13-17.
3. Василенко, Ю.К. Фармакологические свойства тритерпеноидов коры березы [Текст] / Ю.К. Василенко, В.Ф. Семенченко, Л.М. Фролова // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1993. Т. 56. №4. С. 53-55.
4. ГОСТ 23527-79 Кислоты и спирты жирные синтетические. Метод определения карбонильного числа [Текст]. – М.: Издательство стандартов, 1979. – 8 с.
5. Гудвин, Т. Сравнительная биохимия каротиноидов [Текст], пер. с англ. - М.: ИЛ, 1954. - 396 с.
6. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации. V пересмотр. [Текст] Москва 2012
7. Дребущак, Т.Н. Кристаллическая структура сольвата бетулина с этанолом [Текст] / Т.Н. Дребущак, М.А. Михайленко, М.Е. Брезгунова [и др.] // Журнал структурной химии. 2010. Т. 51. № 4. С. 823 – 826.
8. Кислицын, А.Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение [Текст] / А.Н. Кислицын // Химия древесины. 1994. № 3. С. 3–28.
9. Кислицын, А.Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение [Текст] / А.Н. Кислицын // Химия древесины. - М.: Химия, 1994. - 361с.
10. Когай, Т.И. Улучшенный двухстадийный метод получения бетулиновой кислоты из бетулина [Текст] / Т.И. Когай // Journal of Siberian Federal University. Chemistry 1. 2008. P. 97-104.

- 11.Кожевников, И.В. Успехи в области катализа гетерополикислотами [Текст] / И.В. Кожевников // Успехи химии. 1987. Т. LVI, Вып. 9. С. 1417 – 1443.
- 12.Кузнецова, С.А. Получение диацетата бетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантной активности [Текст] / С.А. Кузнецова, Н.Ю. Васильева, Г.С. Калачева [и др.] // Journal of Siberian Federal University. Chemistry. 2008. Т. 2. С. 151-165.
- 13.Кузнецова, С.А. Влияние условий ацетилирования и предварительной обработки бересты коры берёзы на выход и состав тритерпеновых продуктов [Текст] / С.А. Кузнецова, Б.Н. Кузнецов, Г.П. Скворцова [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. 2010. Т. 3, №2. С. 174–182.
- 14.Кучерявый, Ю.А. Гепатопротекторы: рациональные аспекты исследования [Текст]: учебное пособие для врачей / Ю.А. Кучерявый, С.В. Морозов. - М., 2012. - 36 с.
- 15.Левданский, В.А. Влияние ортофосфорной кислоты на химические превращения бетулинола в бутаноле, изобутаноле и уксусной кислоте [Текст] / В.А. Левданский, А.В. Левданский, Б.Н. Кузнецов // Journal of Siberian Federal University. Chemistry 4. 2008. Т. 1. С. 369-375.
- 16.Левданский, В.А. Новые способы одностадийного синтеза аллобетулина, бензоата и фталата аллобетулина [Текст] / В.А. Левданский, А.В. Левданский, Б.Н. Кузнецов // Химия растительного сырья. 2010. №1. С. 75–80.
- 17.Малекин, С.И. Синтез и гидролиз гас-1-алкил-2-ацилглицеро-3-фосфодихлоридов [Текст] / С.И. Малекин, Н.Ю. Хромова, А.В. Кисин [и др.] // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. № 8. С. 617-621.
- 18.Маляр, Ю.Н.Физико-химические свойства механокомпози́тов бетулина и его диацилов с водорастворимыми полимерами [Текст]: дисс. ... канд. хим. наук: 02.00.04 / Маляр Юрий Николаевич. - Красноярск, 2014. С. 8-39.
- 19.Минушкин, О.Н. Урсодезоксихолевая кислота (УДХК) в клинической практике [Текст] / О.Н. Минушкин // Медицинский совет. 2010. № 1-2. С. 10-11.

- 20.Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. [Текст] /А.Н. Миронов. – М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
- 21.Михайленко, М.А. Получение и исследование физико-химических свойств сольватов бетулина [Текст] / М.А. Михайленко, Т.П. Шахтшнейдер, М.Е. Брезгунова [и др.] // Химия растительного сырья. 2010. № 2. С. 63 – 70.
- 22.Мухаммед, А.А. Исследование гипополидемических свойств веществ природного происхождения на основе чеснока, растительных масел и пищевых волокон [Текст]: дис. ... канд. фарм. наук: 14.03.06 / Мухаммед Ариж Абделькаримовна. - М., 2014. С. 11-37.
- 23.Пат. 2150473 Российская Федерация, МПК C07J53/00. Способ получения диацетата бетулинола [Текст] / Государственное унитарное предприятие Центральный научно-исследовательский и проектный институт лесохимической промышленности; заявитель и патентообладатель. Кислицын А.Н., Трофимов А.Н., Патласов В.П., Чупрова В.А.; авторы // № 99117706/04; заяв. 09.08.1999; опубл. 10.06.2000, Бюл. № 16.
- 24.Пат. 2341531 Российская Федерация, МПК C07J53/00, C07J63/00. Способ получения диацетата бетулинола [Текст] / Институт химии и химической технологии СО РАН (ИХХТ СО РАН) (RU); заявитель и патентообладатель. Левданский В.А., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н.; авторы // № 2007138157/04; заяв. 15.10.2007; опубл. 20.12.2008, Бюл. № 35.
- 25.Пат. 2243233 Российская Федерация, МПК C07J53/00, C07J63/00, A61K31/56, A61P37/04. Производные бетулина как ингибиторы комплемента [Текст] / Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова (RU); заявитель и патентообладатель. Каплун А.П., Андия-Правдивый Ю.Э., Буреева С.В., Козлов Л.В., Швец В.И.; авторы // № 2003136931/04; заяв. 24.12.2003; опубл. 27.12.2004, Бюл. № 36.
- 26.Пат. 2174126 Российская Федерация, МПК C07J53/00, C07J63/00. Способ получения аллобетулина [Текст] / Государственное унитарное предприятие

- Центральный научно-исследовательский и проектный институт лесохимической промышленности; заявитель и патентообладатель. Кислицын А.Н., Трофимов А.Н.; авторы // № 2000114281/04; заяв. 05.06.2000; опубл. 27.09.2001, Бюл. № 27.
27. Пат. 2458933 Российская Федерация, МПК C07J53/00, C07J63/00. Способ получения бетулиновой кислоты [Текст] / Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Нижегородская медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ГОУ ВПО НижГМА Минздравсоцразвития России) (RU); заявитель и патентообладатель. Мельникова Н.Б., Ушакова Т.М., Кислицын А.Н., Клабукова И.Н.; авторы // № 2011118845/04; заяв. 10.05.2011; опубл. 20.08.2012, Бюл. № 23. – 8 с.: ил.
28. Пат. 2402561 Российская Федерация, МПК C07J53/00, C07J63/00. Способ получения аллобетулина [Текст] / Учреждение Российской академии наук Институт органической химии Уфимского научного центра РАН (RU); заявитель и патентообладатель. Казакова О.Б., Медведева Н.И., Казаков Д.В., Толстиков Г.А.; авторы // № 2009118202/04; заяв. 13.05.2009; опубл. 27.10.2010, Бюл. № 30. – 7 с.: ил.
29. Пат. 2436791 Российская Федерация, МПК C07J53/00, C07J63/00. Способ получения диацетата бетулинола [Текст] / Учреждение Российской академии наук Институт химии и химической технологии Сибирского отделения РАН (ИХХТ СО РАН) (RU); заявитель и патентообладатель. Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Скворцова Г.П.; авторы // № 2010118396/04; заяв. 06.05.2010; опубл. 20.12.2011, Бюл. № 35.
30. Пат. 2435779 Российская Федерация, МПК C07J63/00. Способ получения 28-гемисукцината бетулина [Текст] / Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН) (RU); заявитель и патентообладатель. Попов С.А., Козлова Л.П., Корнаухова Л.М., Толстиков Г.А.; авторы // № 2010117485/04; заяв. 30.04.2010; опубл. 10.12.2011, Бюл. № 34.

31. Пат. 2270202 Российская Федерация, МПК C07J53/00, C07J63/00. Способ получения бетулина и лупеола [Текст] / Институт органической химии Уфимского научного центра РАН (RU); заявитель и патентообладатель. Юнусов М.С., Комиссарова Н.Г., Беленкова Н.Г.; авторы // № 2004122279/04; заяв. 19.07.2004; опубл. 20.02.2006, Бюл. № 5.
32. Пат. 2270202 Российская Федерация, МПК C07J53/00, C07J63/00. Способ получения бетулина и лупеола [Текст] / Институт органической химии Уфимского научного центра РАН (RU); заявитель и патентообладатель. М.С. Юнусов, Н.Г. Комиссарова, Н.Г. Беленкова; авторы // № 2004122279/04; заяв. 19.07.04; опубл. 20.02.06, Бюл. № 25. – 7 с.: ил.
33. Пат. 2190622 Российская Федерация, МПК C07J053/00 C07J063/00. Способ получения бетулиновой кислоты [Текст] / Рощин В.И.; заявитель и патентообладатель; Рощин В.И., Шабанова Н.Ю., Ведерников Д.Н.; авторы // № 2001135138/04; заяв. 26.12.2001; опубл. 10.10.2002, Бюл. № 28.
34. Пат. 2269541 Российская Федерация, МПК C07J53/00, C07J63/00. Способ получения бетулиновой кислоты [Текст] / Институт химии и химической технологии СО РАН (ИХХТ СО РАН); заявитель и патентообладатель; Левданский В.А., Полежаева Н.И., Кузнецов Б.Н.; авторы // № 2004137442/04; заяв. 21.12.2004; опубл. 10.02.06, Бюл. № 23. – 5 с.: ил.
35. Пат. 2333916 Российская Федерация, МПК C07J53/00, C07J63/00. Способ получения бетулоновой кислоты [Текст] / Институт химии и химической технологии СО РАН (RU); заявитель и патентообладатель. Когай Т.И., Кузнецов Б.Н.; авторы // № 2007109202/04; заяв. 12.03.07; опубл. 20.09.08, Бюл. № 26. – 4 с.: ил.
36. Пат. 2517157 Российская Федерация, МПК A61K 36/185, A61K 31/015. Композиция на основе диацетата бетулина [Текст] / Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения Российской академии наук (ИХХТТМ СО РАН); заявитель и патентообладатель; Кузнецова С.А., Шахтшнейдер Т.П., Михайленко М.А., Маляр Ю.Н., Замай А.С., Болдырев

- В.В.; авторы // № 2013116148/15; заяв. 09.04.2013; опубл. 27.05.14, Бюл. № 15. – 11 с.
37. Пат. 2184120 Российская Федерация, МПК C07J53/00, C07J63/00. Способ получения бетулина [Текст] / В.И. Роцин ; заявитель и патентообладатель. В.И. Роцин, Н.Ю. Шабанова, Д.Н. Ведерников ; авторы. – № 2001103062/04; заяв. 02.02.01 ; опубл. 27.06.02, Бюл. № 18. – 3 с.: ил.
38. Пегова, Р.А. Растительные масла. Состав и перспективы использования масла семян тыквы - *Cucurbita Pepo* в терапии [Текст] / Р.А. Пегова, О.А. Воробьева, Н.Б. Мельникова // Медицинский Альманах. 2014. №2(32). С.127-134.
39. Племенков, В.В. Химия изопреноидов [Текст] / В.В. Племенков. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2007. – 322 с.
40. Позднякова, С.В. Нефропротективный эффект производных бетулоновой кислоты при экспериментальном цитостатическом повреждении почек у крыс [Текст] / С.В. Позднякова, О.Р. Грек, А.С. Фунтиков [и др.] // Бюллетень СО РАМН. 2007. № 5. С. 117–121.
41. Попова, Н.Р. Каталитическое окисление лигнинных веществ с использованием в качестве катализаторов полиоксометаллатов [Текст] / Н.Р. Попова, К.Г. Боголицын, Т.В. Поварницкая // Химия растительного сырья. 2008. № 4. С. 5 – 14.
42. Похилло, Н.Д. Изопреноиды различных видов рода *Betula* [Текст] / Н.Д. Похилло, Н.И. Уварова // Химия природных соединений. 1988. № 3. С. 325 – 341.
43. Программа PASS [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://pharmaexpert.ru/PASSOnline>, свободный (дата обращения 10.11.2015).
44. Регистр лекарственных средств [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.rlsnet.ru>, свободный (дата обращения 23.11.2015).
45. Семенченко, В. Ф. Исследование природных тритерпеноидов в ряду лупана и Р-амирина и разработка на их основе новых лекарственных средств

- [Текст]: дис. ... д-ра фармац. наук: 14.04.02 / Семенченко Владимир Федорович — Пятигорск, 1993. —283 с.
- 46.Сымон, А.В. Синтез циклопропановых производных бетулиновой и бетулоновой кислот и их противоопухолевая активность [Текст] / А.В. Сымон, Н.Н. Веселова, А.П. Каплун [и др.] // Биоорганическая химия. 2005. Т. 31. №3. С. 320-325.
 - 47.Толстиков, Г.А. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность [Текст] / Г.А. Толстиков, О.Б. Флехтер, Э.Э. Шульц [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. 2005. № 13. С. 1–30.
 - 48.Толстикова, Т.Г. Терпеноиды ряда лупана - биологическая активность и фармакологические перспективы. Производные ряда лупана [Текст] / Т.Г. Толстикова, И.В. Сорокина // Биоорганическая химия. 2006. №1. С.42-55.
 - 49.Флехтер, О.Б. Синтез 3-О-ацетил-бетулиновго и бетулонового альдегидов по Сверну и фармакологическая активность их оксимов [Текст] / О.Б. Флехтер, О.Ю. Ашавина, Е.И. Бореко [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. 2002. Т. 36. № 6. С. 21-24.
 - 50.Флехтер, О.Б. Получение бетулиновой кислоты из экстракта бетулина. Противовирусная и противоязвенная активность некоторых родственных терпеноидов [Текст] / О.Б. Флехтер, Л.Р. Нигматуллина, Л.А. Балтина [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. 2002. Т. 36, № 9. С. 26–28.
 - 51.Флехтер, О.Б. Синтез эфиров тритерпеноидов группы лупана и их гепатопротекторная активность [Текст] / О.Б. Флехтер, Л.Т. Карачурина, В.В. Поройков [и др.] // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26, №3. С.215-223.
 - 52.Флехтер, О.Б. Синтез и противовирусные свойства производных лупановых тритерпеноидов [Текст] / О.Б. Флехтер, Е.И. Бореко, Л.Р. Нигматулина [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т 38, № 7. С. 10–13.
 - 53.Хлебникова, Т.Б. Каталитическое окисление бетулина и диацетата бетулина с использованием экологически благоприятного окислителя [Текст] / Т.Б. Хлебникова, З.П. Пай, Б.Н. Кузнецов [и др.] // Journal of Siberian Federal University. 2008. Т. 1. С. 277-285.

- 54.Хромова, Н.Ю. Препаративный способ синтеза 1,2- и 1,3-дизамещенных фосфатидовых кислот [Текст] / Н.Ю. Хромова, С.И. Малекин, А.В. Кисин [и др.] // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25, № 4. С. 306-311.
- 55.Шон, Л. Б. Синтез бетулиновой кислоты из бетулина и исследование ее солюбилизации с помощью липосом [Текст] / Л. Б. Шон, А.П. Каплун, А.А. Шпилевский [и др.] // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24, № 10. С. 787 – 793.
- 56.Abu-jaish, A. «Prodrugs Overview» in «Prodrugs Design – A New Era» [Text] / A. Abu-jaish, S. Jumaа, R. Karaman // – Nova Publisher. – USA. – 2014. – p. 77-102.
- 57.Amjad, M. Qandil. Prodrugs of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), More Than Meets the Eye: A Critical Review [Text] / Amjad M.Q. // International Journal of Molecular Sciences. 2012. Vol. 13. P. 17244-17274.
- 58.Ardabili, A. Chemical Composition and Physicochemical Properties of Pumpkin Seeds (*Cucurbita pepo* Subsp. *pepo* Var. *Styriaca*) Grown in Iran [Text] / A. Ardabili, R. Farhoosh, M. Khodaparast // Journal of Agricultural Science and Technology. 2011. Vol. 13. P.1053-1063.
- 59.Ashavina, O.Y. Oxidation of betulin and its acetates with dimethyldioxirane [Text] / O.Y. Ashavina, N. Kabalnova, O.B. Flekhter [et al.] // Mendeleev Communications. 2004. P. 221 – 223.
- 60.Azevedo-Meleiro, C. Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo* [Text] / C. Azevedo-Meleiro, D. Rodriguez-Amaya // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007. Vol. 55, № 10. P. 4027-4033.
- 61.Baltina, L.A. Lupane triterpenes and derivatives with antiviral activity [Text] / L.A. Baltina, O.B. Flekhter, L.R. Nigmatullina [et al.] // Bioorganic and medicinal chemistry. 2003. Vol. 13. P. 3549-3552.
- 62.Bastos, D.Z.L. Biotransformation of betulinic acid by fungi [Text] / D.Z.L. Bastos, I.C. Pimentel, D.A. Jesus [et al.] // Phytochemistry. 2007. Vol. 68. P. 834–839.

63. Byrn, S.R. Solid-State Chemistry of Drugs [Text] / S.R. Byrn, R.R. Pfeiffer, J.G. Stowell [et al.] // SSCI, West Lafayette, IN, 1999.
64. Carr, T. Food ingredients that reduce cholesterol absorption [Text] / T. Carr, E. Jesch // Advances in Food and Nutrition Research. 2006. №51. P. 165–204.
65. Carr, T. Cholesterol-lowering phytosterols: factors affecting their use and efficacy [Text] / T. Carr, M. Ash, A. Brown // Nutrition and Dietary Supplements. 2010. Vol. 2. P. 59-72.
66. Chatterjee, P. Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368 [Text] / P. Chatterjee, S.A. Kouzi, J.M. Pezzuto // Applied and environmental microbiology. 2000. Vol. 66, № 9. P. 3850–3855.
67. Cichewicz, R.H. Chemistry, Biological Activity and Chemotherapeutic Potential of Betulinic Acid for the Prevention and Treatment of Cancer and HIV Infection [Text] / R.H. Cichewicz, S.A. Kouzi // Medicinal Research Reviews. 2004. Vol. 24. № 1. P. 90–114.
68. Ciurlea, S. Birch tree outer bark, a natural source of bioactive pentacyclic triterpenes with an antitumor activity [Text] / S. Ciurlea, C. Soica, D. Ionescu [et al.] // Journal of Agroalimentary Processes and Technologies. 2010. Vol. 16, № 3. P. 328–332.
69. Darrick Kim, S.H.L. A concise semio-synthetic approach to betulinic acid from betulin [Text] / S.H.L. Darrick Kim, Z. Chen, T.V. Nguyen [et al.] // Synthetic Communications. 1997. Vol. 27. P. 1607 – 1612.
70. Delia, B. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods [Text] / Brasil: ILSI Press. 2001. - 64 p.
71. Eckerman, Ch. Comparison of solvents for extraction and crystallisation of betulinol from birch bark waste [Text] / Ch. Eckerman // Paperi ja Puu. 1985. №3. P. 100-106.
72. Falamas, A. Spectroscopic investigations of newly formed betulin-cyclodextrin guest-host type complexes as potential anti skin cancer candidates [Text] / A.

- Falamas, S.C. Pinzaru, V. Chis [et al.] // Journal of Molecular Structure. 2011. Vol. 993. P. 297–301.
73. Fruhwirth, G. Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities [Text] / G. Fruhwirth, A. Hermetter // European Journal of Lipid Science and Technology. 2007. Vol. 109, №11. P. 1128–1140.
74. Komissarova, N.G. Selective oxidation of betulin by Cr (VI) reagents [Text] / N.G. Komissarova, N.G. Belenkova, L.V. Spirikhin [et al.] // Chemistry of Natural Compounds. 2002. Vol. 38, № 1. P. 58 – 61.
75. Kvasnica, M. Synthesis of phthalates of betulonic acid and betulin with cytotoxic activity [Text] / M. Kvasnica, J. Sarek, E. Klinotova [et al.] // Bioorganic and medicinal chemistry. 2005. Vol. 13. P. 3447-3454.
76. Lavoie, S. Synthesis of betulin derivatives with solid supported reagents [Text] / S. Lavoie, A. Pichette, F.-X. Garneau [et al.] // Synthetic Communications. 2001. Vol. 31. № 10. P. 1565 – 1571.
77. Li, T-S. Simple synthesis of allobetulin, 28-oxyallobetulin and related biomarkers from betulin and betulonic acid catalysed by solid acids [Text] / T-S. Li, J-X. Wang, X-J. Zheng // Journal of the Chemical Society. 1998. № 1. P. 3957–3965.
78. Liu, J. Biotransformation optimization of betulin into betulonic acid production catalysed by cultured *Armillaria luteo-virens* Sacc ZJUQH100 – 6 cells [Text] / J. Liu, M.L. Fu, Q.H. Chen // Journal of Applied Microbiology. 2010. Vol. 110. P. 90–97.
79. Melnikova, N. A Practical Synthesis of Betulonic Acid Using Selective Oxidation of Betulin on Aluminium Solid Support [Text] / N. Melnikova, I. Burlova, T. Kiseleva [et al.] // Molecules. 2012. Vol. 17. P. 11849 – 11863.
80. Monaco, P. Isoprenoids from the leaves of *Quercus suber* [Text] / P. Monaco // Journal of Natural Products. 1984. Vol. 47, № 4. P. 673 – 676.
81. Muffler, K. Biotransformation of triterpenes [Text] / K. Muffler, D. Leipold, M. Scheller [et al.] // Process Biochemistry. 2011. Vol. 46. P. 1–15.

82. Mullauer, F.B. Betulin is a potent anti-tumor agent that is enhanced by cholesterol [Text] / F.B. Mullauer, J.H. Kessler, J.P. Medema // PLoS ONE. 2009. Vol. 4. Issue 4.
83. Ostlund, R. Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans [Text] / R. Ostlund, S. Racette, A. Okeke [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. 2002. №75. P. 1000-1004.
84. Parrya, J. Characterization of Cold-Pressed Onion, Parsley, Cardamom, Mullein, Roasted Pumpkin, and Milk Thistle Seed Oils [Text] / J. Parrya, Z. Haob, M. Luthera [et al.] // Journal of American Oil Chemists' Society. 2006. Vol. 83. №10. P. 847-854.
85. Pat. US 5658947. Method and composition for selectively inhibiting melanoma using betulinic acid [Text] / Das Gupta T.K., Pezzuto J.M. // Board of Trustees of University of Illinois. Date of patent 19.08.97, P. 6.
86. Pat. US 6458834. Pentacyclic triterpenes [Text] / Glinski J., Branly K.L. // Date of patent 01.10.2002, P. 9.
87. Pat. US 3966778. Production of 21-phosphate corticoids having unprotected hydroxyl radicals at least at the 17 α - and 21-position [Text] / H. Masuya, T. Miki // Date of Patent 29.06.1976. P. 4.
88. Pat. US 6689767. Triterpenes having antibacterial activity [Text] / P.A. Krasutsky, R.M. Carlson, R. Karim // Date of patent 10.02.2004. P. 34.
89. Pat. US 5804575. Methods of manufacturing betulinic acid [Text] / J.M. Pezzuto, S.H.L. Darrick Kim // Date of patent 08.09.1998. P.7.
90. Pat. US 3764616. 21-phosphate esters of 17 α -acyloxy-21 hydroxy steroids of the pregnane series [Text] / J. Elks, P.J. May, G.H. Phillipps // Date of patent 09.10.1973. P. 8.
91. Pat. US 2936313. Preparation of steroidal 21-phosphate derivatives [Text] / J. Elks // Date of patent 10.05.1960 P. 6.
92. Pat. 3053834. 21-phosphates of steroid acetals and ketals. J. Fried. Princeton Date of patent 11.09.1962 Fried J. P. 6.

93. Pat. 3073816 Process of producing *z*-orthophosphates of steroids and the 21-diamide ortho phosphate intermediates therefor [Text] / K. Irmscher, W. Schumann // Date of patent 15.01.1963. P. 6.
94. Pohjala, L. Betulin-derived as inhibitors of alphavirus replication [Text] / L. Pohjala, S. Alakurtti, T. Ahola [et al.] // Journal of Natural Products. 2009. № 72 (11). P. 1917-1926.
95. Polyakov, N.E. Antioxidant and redox properties of supramolecular complexes of carotinoids with β -glycyrrhizic acid [Text] / N.E. Polyakov, T.V. Leshina, N.F. Salakhutdinov [et al.] // Free Radical Biology & Medicine. 2006. № 40. P. 1804–1809.
96. Polykov, N.E. Host-Guest Complexes of Carotenoids with β -Glycyrrhizic Acid [Text] / N.E. Polykov, T.V. Leshina, N.F. Salakhutdinov [et al.] // The Journal of Physical Chemistry. 2006. №110. P. 6991-6998.
97. Pichette, A. Selective oxidation of betulin for the preparation of betulinic acid, an antitumoral compound [Text] / A. Pichette, H. Liu, C. Roy [et al.] // Synthetic Communications. 2004. Vol. 34. P. 3925 – 3937.
98. Rodriguez-Amaya, D.B. HarvestPlus Handbook for Carotinoid analysis [Text] / D.B. Rodriguez-Amaya, M. Kimura // 2004, P.64.
99. Safari, M.R. Effects of Vitamin E and Volatile Oils on the Susceptibility of Low-Density Lipoprotein to Oxidative Modification [Text] / M.R. Safari // Iranian Biomedical Journal. 2003. № 7(2). P.79
100. Sedigheh, A. Hypoglycaemic and hypolipidemic effects of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) on alloxan-induced diabetic rats [Text] / A. Sedigheh, M.S. Jamal, S. Mahbubeh [et al.] // African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2011. Vol. 5(23). P. 2620-2626.
101. Schoenheimer, R. New contributions in sterol metabolism [Text] / R. Schoenheimer // Science. 1931. №74. P. 579–584.
102. Shaifali, D. Prodrugs: a Review [Text] / D. Shaifali, V. Vandana // World Journal of Pharmaceutical Research. 2014. Vol. 3, Issue 7. P. 277-297.

103. Tayebee, R. Enviromenmentally benign oxidation of some alcohols with 34 % hydrogen peroxide catalysed by H₃PW₁₂O₄₀ [Text] / R. Tayebee, M.H. Alizadeh // Current Science. 2007. Vol. 93, № 2. P. 133 – 135.
104. Venu, S. Oxidation reactions of thymol: a pulse radiolysis and theoretical study [Text] / S. Venu, D.B. Naik, S.K. Sarkar [et al.] // The Journal of Physical Chemistry A. 2013. № 117 (2). P. 291-299.
105. Vikström, F. Sterols and triterpenyl alcohols in common pulpwoods and black liquor soaps [Text] / F. Vikström, B. Holmbom, A. Hamunen // European Journal of Wood and Wood Products. 2005. №63. P. 303–308.
106. Vorobyova, O.A. Analysis of the Components of Pumpkin Seed Oil in Suppositories and the Possibility of Its Use in Pharmaceuticals [Text] / O.A. Vorobyova, A.E. Bolshakova, R.A. Pegova [et al.] // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2014. № 6(5). P. 1106-1116.
107. Widy-Tyszkiewicz, E. Assessment report on Cucurbita Pepo L. semen [Text] / E. Widy-Tyszkiewicz // European Medicines Agency. Science medicines health. 2012. P. 19-28.
108. Winter, G. Polymorphs and solvates of molecular solids in the pharmaceutical industry [Text] / G. Winter // Reactivity of Molecular Solids. Ed. Boldyreva, E.V., Boldyrev, V.V. New York a.o.: John Wiley & Sons LTD. 1999. P. 241–270.
109. Zawilska, J.B. Prodrugs: A challenge for the drug development / Jolanta B. Zawilska, J. Wojcieszak, Agnieszka B. Olejniczak [Text] / J.B. Zawilska // Pharmacological Reports. 2013. № 65. P. 1-14.

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 pepo* 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 гипополидемического 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 гипополидемического 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 гипополипидемическое 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 гипополипидемического 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.

Приложение 1. Проект фармакопейной статьи «Бетулоновая кислота»**БЕТУЛОНОВАЯ КИСЛОТА,**

субстанция

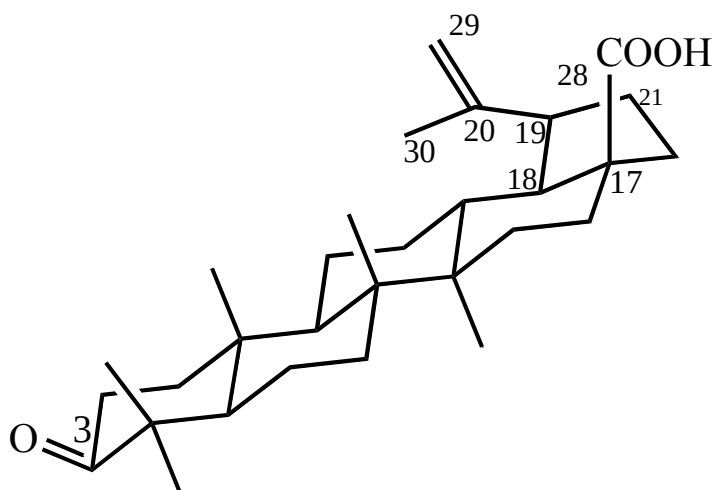
Международное непатентованное название:

Бетулоновая кислота.

Химическое название:

Луп-20(29)-ен-3-он-28-овая кислота.

Структурная формула:

Эмпирическая формула: $C_{30}H_{46}O_3$

Молекулярная масса: 454,7

Препарат содержит не менее 95,0 % $C_{30}H_{46}O_3$ в пересчете на сухое вещество.

Нормы качества субстанции Бетулоновая кислота

ПОКАЗАТЕЛЬ	МЕТОД	НОРМА
Описание	Визуальный	Белый кристаллический порошок
Растворимость	ГФ XIII	Легко растворим в диоксане, хлороформе, ацетоне и толуоле, умеренно растворим в этаноле 96%, изопропаноле, дихлорметане, этилацетате и ацетонитриле, практически нерастворим в воде.
Подлинность	ИК-спектроскопия	ИК-спектр субстанции должен соответствовать ИК-спектру чистой бетулоновой кислоты.
	ТСХ	Величина R_f пятна субстанции должна соответствовать величине R_f стандартного образца бетулоновой кислоты.
	ВЭЖХ (одновременно с количественным определением)	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора субстанции должно соответствовать времени удерживания пика бетулоновой кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца бетулоновой кислоты.
	Реакция с ванилином в конц. серной кислоте	Появление малинового окрашивания.
Посторонние примеси	ВЭЖХ	Суммарное содержание примесей – не более 5,0%.
Потеря в массе при высушивании	ГФ XIII	Не более 0,5 %

Сульфатная зола	ГФ XIII	Не более 0,1 %
Остаточные органические растворители	ГЖХ ГФ XIII	
Микробиологическая чистота	ГФ XIII	- Общее число аэробных бактерий не более 10^4 в 1 г; - Общее число грибов не более 10^2 в 1 г; - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г; - Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г; - Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г; - Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г; - Энтеробактерий не более 10^2 в 1 г.
Количественное определение	ВЭЖХ	от 95 до 105 % ($C_{30}H_{46}O_3$) в пересчете на сухое вещество
Хранение	В хорошо укупоренной таре. В сухом, прохладном, защищенном от света месте, при температуре от 0 до $+10^{\circ}C$.	
Срок годности	3 года	

Описание. Белый кристаллический порошок.

Растворимость. Легко растворим в диоксане, хлороформе, ацетоне и толуоле, умеренно растворим в этаноле 96%, изопропанолем, дихлорметане, этилацетате и ацетонитриле, практически нерастворим в воде.

Подлинность. Инфракрасный спектр субстанции бетулоновой кислоты в КВг в области от 4000 до 400 см^{-1} по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца бетулоновой кислоты.

Анализ методом тонкослойной хроматографии проводят одновременно с испытаниями на посторонние примеси.

Около 0,1000 г (точная навеска) субстанции бетулоновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл этанола 96 %, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

По 10 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца (СО) бетулоновой кислоты наносят на линию старта пластинки Сорбфил размером 10 × 15 см (ТУ 26-11-17-89) или аналогичной.

Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 15 мин, затем помещают в камеру со смесью растворителей: гексан – этилацетат (80:20) и хроматографируют восходящим методом.

Когда фронт растворителей продвинется до линии финиша, ее вынимают из камеры и сушат на воздухе до исчезновения запаха растворителей и выдерживают при температуре 40-60 °С в течение 10 мин. Затем пластинку проявляют в парах йода в течение 3-5 мин.

На хроматограмме основное пятно, полученное при хроматографировании раствора испытуемой субстанции, должно находиться на уровне основного пятна, полученного при хроматографировании СО бетулоновой кислоты.

Примечание. 1. Приготовление раствора СО бетулоновой кислоты. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции бетулоновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл этанола 96 %, доводят этанолом до метки и перемешивают.

2. Приготовление системы растворителей. В конической колбе смешивают гексан и этилацетат в соотношении 80:20. Полученную смесь используют для хроматографирования.

3. Приготовление хроматографической камеры. В камеру наливают приготовленную систему растворителей. Стенки камеры обкладывают фильтровальной бумагой для насыщения парами растворителей. Камера должна быть насыщена парами растворителей в течение 1 ч.

4. Подготовка пластинки Сорбфил. Пластинку помещают в камеру с водой. Когда фронт растворителя дойдет до линии финиша, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 10 мин и активируют в сушильном шкафу при температуре 105 – 110 °С в течение 30 мин.

Анализ методом обращено-фазовой жидкостной хроматографии проводится одновременно с количественным определением. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного образца бетулоновой кислоты.

Бетулоновая кислота, реагируя с с ванилином в концентрированной серной кислоте, образует ярко-малиновое окрашивание.

Посторонние примеси. Определение проводят методом обращено-фазовой жидкостной хроматографии по методике количественного определения.

Хроматограммы стандартного образца и испытуемого раствора регистрируют трижды.

Содержание бетулонового альдегида и бетулина в субстанции бетулоновой кислоты в процентах (х) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 25 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot 25} = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_1},$$

где S_0 – среднее значение площади пика бетулонового альдегида, вычисленное по трем хроматограммам раствора СО;

a_0 – навеска субстанции, г;

S_1 – среднее значение площади пика бетулонового альдегида, вычисленное по трем хроматограммам испытуемого раствора;

a_0 – навеска бетулонового альдегида, взятая для приготовления раствора СО, г;

P – содержание бетулонового альдегида в СО в пересчете на безводное вещество, %.

Суммарное содержание примесей в субстанции бетулоновой кислоты должно быть не более 5 %.

Примечание. 1. Приготовление раствора СО бетулонового альдегида. Около 0,013 г (точная навеска) стандартного образца бетулонового альдегида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл этанола 96 %, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. (150 % содержания основного вещества)

Раствор используют свежеприготовленным.

2. Приготовление раствора СО бетулина. Около 0,013 г (точная навеска) стандартного образца бетулина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл этанола 96 %, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. (150 % содержания основного вещества)

Раствор используют свежеприготовленным.

3. Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику бетулонового альдегида, не менее 10000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика бетулонового альдегида не более 2,0;

- относительное время удерживания бетулонового альдегида – 1,73 (11,5 мин), бетулоновой кислоты – 1,0 (6,65 мин); бетулина – 1,12 (7,43 мин)
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное по площадям пиков бетулонового альдегида, полученное для трех вводов раствора СО, составляет не более 2%.

Потеря в массе при высушивании. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII, Том 1, ОФС 1.2.1.0010.15.

Около 1,0 г (точная навеска) субстанции бетулоновой кислоты сушат при температуре 100-105 °С до постоянной массы. Потеря в массе при высушивании не должна превышать 0,5 %.

Сульфатная зола. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII, Том 1, ОФС 1.2.2.2.0014.15.

Содержание сульфатной золы в 1,0 г (точная навеска) субстанции бетулоновой кислоты должно быть не более 0,1 %.

Остаточные органические растворители. Определение проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII, Том 1, ОФС 1.1.0008.15.

Микробиологическая чистота. Испытание проводится в соответствии с требованиями ГФ XIII, Том 1, ОФС 1.2.4.0002.15.

Количественное определение. Около 0,013 г (точная навеска) субстанции бетулоновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл этанола 96 %, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм.

Условия хроматографирования:

- металлическая колонка, заполненная C_{18} с диаметром частиц 5 мкм (250 x 4,6 мм), например, Supelco;
- подвижная фаза (ПФ) – смесь ацетонитрил : вода (90 : 10, об. %);
- объем вводимой пробы – 20 мкл;

- скорость потока ПФ – 1,0 мл/мин;
- детектор – диодно-матричный УФ детектор, 196 нм и 210 нм;
- температура колонки - 40 °С.

Возможна корректировка ПФ для выполнения теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматограммы стандартных и испытуемого растворов регистрируют трижды.

Содержание бетулоновой кислоты рассчитывается программой LCsolution по данным линейной калибровочной функции производной от трёх стандартных растворов. Вычисления основаны на измерении площадей пиков.

Содержание бетулоновой кислоты должно быть в течение срока годности от 95 до 105 % (в пересчете на сухое вещество).

Результаты считаются достоверными, если выполняется требование теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Примечание. 1. Приготовление стандартного раствора 1. Около 0,025 г (точная навеска) субстанции бетулоновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл этанола 96 %, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. (150 % содержания основного вещества) Раствор используют свежеприготовленным.

2. Приготовление стандартного раствора 2. 12,5 мл стандартного раствора 1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят этанолом 96 % до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. (100 % содержания основного вещества) Раствор используют свежеприготовленным.

3. Приготовление стандартного раствора 3. 6,25 мл стандартного раствора 1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят этанолом 96 % до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. (50 % содержания основного вещества) Раствор используют свежеприготовленным.

4. Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику бетулоновой кислоты, не менее 10000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика бетулоновой кислоты не более 2,0;
- коэффициент корреляции градуировочного графика для бетулоновой кислоты не менее 0,95;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное по площадям пиков бетулоновой кислоты, полученное для трех вводов стандартного раствора 2, составляет не более 2%.

Упаковка. По 10 г в стеклянные банки с навинчивающейся, плотно закрытой крышкой.

Маркировка. На этикетке указывают производителя, адрес, название субстанции на русском языке, количество, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности.

Транспортирование. В соответствии с РД 9301-006-05749470-93

Хранение. В хорошо укупоренной таре. В сухом, прохладном, защищенном от света месте, при температуре от 0 до +10⁰С.

Срок годности. 3 года.

Приложение 2. Проект фармакопейной статьи «Диацетат бетулина»**ДИАЦЕТАТ БЕТУЛИНА,**
субстанция

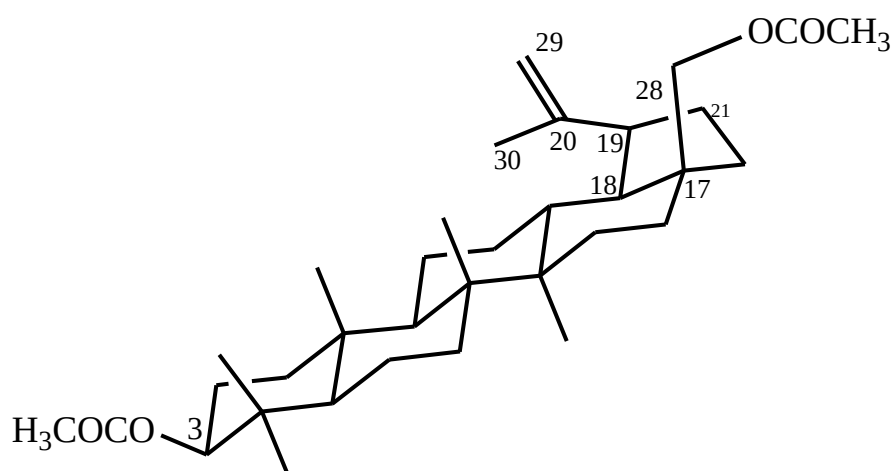
Международное непатентованное название:

Диацетат бетулина.

Химическое название:

3β, 28-диацетокси-луп-20(29)-ен(1).

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{34}H_{54}O_4$

Молекулярная масса: 526,8

Препарат содержит не менее 95,0 % $C_{34}H_{54}O_4$ в пересчете на сухое вещество.

Нормы качества субстанции Диацетат бетулина

ПОКАЗАТЕЛЬ	МЕТОД	НОРМА
Описание	Визуальный	Бежевый кристаллический порошок
Растворимость	ГФ XIII	Легко растворим в диоксане, хлороформе, ацетоне и толуоле, растворим в этаноле 96%, изопропанолe, дихлорметане, этилацетате и ацетонитриле, практически нерастворим в воде.
Подлинность	ИК-спектроскопия	ИК-спектр субстанции должен соответствовать ИК-спектру чистого диацетата бетулина.
	ТСХ	Величина Rf пятна субстанции должна соответствовать величине Rf стандартного образца диацетата бетулина.
	ВЭЖХ (одновременно с количественным определением)	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора субстанции должно соответствовать времени удерживания пика диацетата бетулина на хроматограмме раствора стандартного образца диацетата бетулина.
	Реакция с ванилином в конц. серной кислоте	Появление малинового окрашивания.
Посторонние примеси	ВЭЖХ	Суммарное содержание примесей – не более 5,0%.
Потеря в массе при высушивании	ГФ XIII	Не более 0,5 %

Сульфатная зола	ГФ XIII	Не более 0,1 %
Остаточные органические растворители	ГЖХ ГФ XIII	
Микробиологическая чистота	ГФ XIII	- Общее число аэробных бактерий не более 10^4 в 1 г; - Общее число грибов не более 10^2 в 1 г; - Отсутствие <i>Escherichia coli</i> в 1 г; - Отсутствие <i>Salmonella</i> в 10 г; - Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г; - Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г; - Энтеробактерий не более 10^2 в 1 г.
Количественное определение	ВЭЖХ	от 95 до 105 % ($C_{34}H_{54}O_4$) в пересчете на сухое вещество
Хранение	В хорошо укупоренной таре. В сухом, прохладном, защищенном от света месте, при температуре от 0 до $+10^{\circ}C$.	
Срок годности	3 года	

Описание. Бежевый кристаллический порошок.

Растворимость. Легко растворим в диоксане, хлороформе, ацетоне и толуоле, растворим в этаноле 96%, изопропаноле, дихлорметане, этилацетате и ацетонитриле, практически нерастворим в воде.

Подлинность. Инфракрасный спектр субстанции диацетата бетулина в KBr в области от 4000 до 400 см^{-1} по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца диацетата бетулина.

Анализ методом тонкослойной хроматографии проводят одновременно с испытаниями на посторонние примеси.

Около 0,1 г (точная навеска) субстанции диацетата бетулина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл этанола 96 %, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

По 10 мкл испытуемого раствора и раствора стандартного образца (СО) диацетата бетулина наносят на линию старта пластинки Сорбфил размером 10 × 15 см (ТУ 26-11-17-89) или аналогичной.

Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 15 мин, затем помещают в камеру со смесью растворителей: гексан – этилацетат (80:20) и хроматографируют восходящим методом.

Когда фронт растворителей продвинется до линии финиша, ее вынимают из камеры и сушат на воздухе до исчезновения запаха растворителей и выдерживают при температуре 40-60 °С в течение 10 мин. Затем пластинку проявляют в парах йода в течение 3-5 мин.

На хроматограмме основное пятно, полученное при хроматографировании раствора испытуемой субстанции, должно находиться на уровне основного пятна, полученного при хроматографировании СО диацетата бетулина.

Примечание. 1. Приготовление раствора СО диацетата бетулина. Около 0,1 г (точная навеска) субстанции диацетата бетулина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл этанола 96 %, доводят этанолом до метки и перемешивают.

2. Приготовление системы растворителей. В конической колбе смешивают гексан и этилацетат в соотношении 80:20. Полученную смесь используют для хроматографирования.

3. Приготовление хроматографической камеры. В камеру наливают приготовленную систему растворителей. Стенки камеры обкладывают фильтровальной бумагой для насыщения парами растворителей. Камера должна быть насыщена парами растворителей в течение 1 ч.

4. Подготовка пластинки Сорбфил. Пластинку помещают в камеру с водой. Когда фронт растворителя дойдет до линии финиша, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 10 мин и активируют в сушильном шкафу при температуре 105 – 110 °С в течение 30 мин.

Анализ методом обращено-фазовой жидкостной хроматографии проводится одновременно с количественным определением. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного образца диацетата бетулина.

Диацетат бетулина, реагируя с ванилином в концентрированной серной кислоте, образует малиновое окрашивание.

Посторонние примеси. Определение проводят методом обращено-фазовой жидкостной хроматографии по методике количественного определения.

Хроматограммы стандартного образца и испытуемого раствора регистрируют трижды.

Содержание моноацетата и бетулина в субстанции диацетата бетулина в процентах (x) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 25 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot 25} = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_1},$$

где S_0 – среднее значение площади пика моноацетата бетулина, вычисленное по трем хроматограммам раствора СО;

a_0 – навеска субстанции, г;

S_1 – среднее значение площади пика моноацетата бетулина, вычисленное по трем хроматограммам испытуемого раствора;

a_0 – навеска моноацетата бетулина, взятая для приготовления раствора СО, г;

P – содержание моноацетата бетулина в СО в пересчете на безводное вещество, %.

Суммарное содержание примесей моноацетата и бетулина в субстанции диацетата бетулина должно быть не более 5 %.

Примечание. 1. Приготовление раствора СО моноацетата бетулина. Около 0,013 г (точная навеска) стандартного образца моноацетата бетулина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл этанола 96 %, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. (150 % содержания основного вещества).

Раствор используют свежеприготовленным.

2. Приготовление раствора СО бетулина. Около 0,013 г (точная навеска) стандартного образца бетулина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл этанола 96 %, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. (150 % содержания основного вещества)

Раствор используют свежеприготовленным.

3. Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику бетулонового альдегида, не менее 10000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика бетулонового альдегида не более 2,0;

- относительное время удерживания моноацетата бетулина – 0,73 (15,27 мин), диацетата бетулина – 1,0 (20,79 мин); бетулина – 0,36 (7,43 мин)
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное по площадям пиков моноацетата бетулина, полученное для трех вводов раствора СО, составляет не более 2%.

Потеря в массе при высушивании. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII, Том 1, ОФС 1.2.1.0010.15.

Около 1,0 г (точная навеска) субстанции диацетата бетулина сушат при температуре 100-105 °С до постоянной массы. Потеря в массе при высушивании не должна превышать 0,5 %.

Сульфатная зола. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII, Том 1, ОФС 1.2.2.2.0014.15.

Содержание сульфатной золы в 1,0 г (точная навеска) субстанции диацетата бетулина должно быть не более 0,1 %.

Остаточные органические растворители. Определение проводят в соответствии с требованиями ГФ XIII, Том 1, ОФС 1.1.0008.15.

Микробиологическая чистота. Испытание проводится в соответствии с требованиями ГФ XIII, Том 1, ОФС 1.2.4.0002.15.

Количественное определение. Около 0,013 г (точная навеска) субстанции диацетата бетулина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл этанола 96 %, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм.

Условия хроматографирования:

- металлическая колонка, заполненная C_{18} с диаметром частиц 5 мкм (250 x 4,6 мм), например, Supelco;
- подвижная фаза (ПФ) – смесь ацетонитрил : вода (90 : 10, об. %);
- объем вводимой пробы – 20 мкл;
- скорость потока ПФ – 1,0 мл/мин;

- детектор – диодно-матричный УФ детектор, 196 нм и 210 нм;
- температура колонки - 40 °С.

Возможна корректировка ПФ для выполнения теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматограммы стандартных и испытуемого растворов регистрируют трижды.

Содержание диацетата бетулина рассчитывается программой LCsolution по данным линейной калибровочной функции производной от трёх стандартных растворов. Вычисления основаны на измерении площадей пиков.

Содержание диацетата бетулина должно быть в течение срока годности от 95 до 105 % (в пересчете на сухое вещество).

Результаты считаются достоверными, если выполняется требование теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Примечание. 1. Приготовление стандартного раствора 1. Около 0,025 г (точная навеска) субстанции диацетата бетулина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл этанола 96 %, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. (150 % содержания основного вещества) Раствор используют свежеприготовленным.

2. Приготовление стандартного раствора 2. 12,5 мл стандартного раствора 1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят этанолом 96 % до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. (100 % содержания основного вещества) Раствор используют свежеприготовленным.

3. Приготовление стандартного раствора 3. 6,25 мл стандартного раствора 1 помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят этанолом 96 % до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. (50 % содержания основного вещества) Раствор используют свежеприготовленным.

4. Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику диацетата бетулина, не менее 10000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика диацетата бетулина не более 2,0;
- коэффициент корреляции градуировочного графика для диацетата бетулина не менее 0,95;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное по площадям пиков диацетата бетулина, полученное для трех вводов стандартного раствора 2, составляет не более 2%.

Упаковка. По 10 г в стеклянные банки с навинчивающейся, плотно закрытой крышкой.

Маркировка. На этикетке указывают производителя, адрес, название субстанции на русском языке, количество, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности.

Транспортирование. В соответствии с РД 9301-006-05749470-93

Хранение. В хорошо укупоренной таре. В сухом, прохладном, защищенном от света месте, при температуре от 0 до +10⁰С.

Срок годности. 3 года.

Приложение 3. Проект фармакопейной статьи «Бетулитим»

«БЕТУЛИТИМ»,

фитопрепарат

Состав, масс. %:

Бетулоновая кислота	0,5
Диацетат бетулина	0,5
Тимол	0,1
(ФС.2.1.0040.15)	
Масло семян тыквы	до 100
(ФС 42-8110-06)	

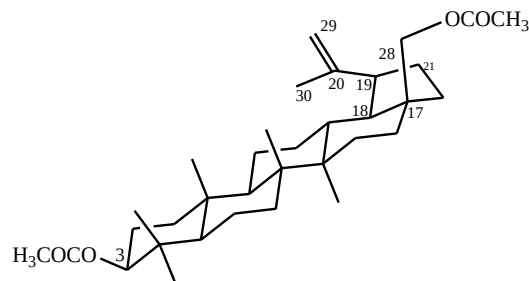
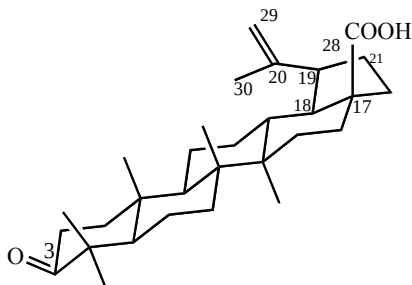
Лекарственная форма:

Капсулы.

Действующие вещества:

Международное непатентованное название	Бетулоновая кислота	Диацетат бетулина
Химическое название	луп-20(29)-ен-3-он-28- овая кислота	3β, 28-диацетокси-луп-20(29)- ен(1)
Эмпирическая формула	$C_{30}H_{46}O_3$	$C_{34}H_{54}O_4$
Молекулярная масса	454,7	526,8

Структурная
формула



Нормы качества препарата «Бетулитим»

ПОКАЗАТЕЛЬ	МЕТОД	НОРМА
Описание	Визуальный	Твёрдые желатиновые капсулы №0. Корпус жёлтого цвета, крышечка тёмно-зелёного цвета. Содержимое капсулы – маслянистая жидкость без запаха и вкуса, допускается наличие нерастворенных частиц в виде белых вкраплений.
Подлинность	ИК-спектроскопия (бетулоновая кислота, диацетат бетулина)	ИК-спектр содержимого капсул должен иметь те же реперные полосы, что и ИК-спектры стандартных образцов бетулоновой кислоты и диацетата бетулина.
	ВЭЖХ (одновременно с количественным определением) (бетулоновая кислота, диацетат бетулина, α - и β - токоферолы)	Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика бетулоновой кислоты и диацетата бетулина на хроматограмме растворов стандартных образцов.
	Реакция с ванилином в конц. серной кислоте (бетулоновая кислота, диацетат бетулина)	Появление малинового окрашивания.
	УФ-спектроскопия (МСТ)	УФ-спектр гексанового раствора фитопрепарата должен иметь 2 максимума поглощения при длинах волн 424 и 434 нм
Масса содержимого	НД	От 0,18 до 0,22 г
Количественное определение	ВЭЖХ (бетулин, диацетат бетулина)	от 0,45 до 0,55 % бетулина и от 0,45 до 0,55 % диацетата бетулина в пересчете на сухое вещество

Микробиологическая чистота	ГФ XIII	Категория 2
Упаковка	НД	По 50 г в алюминиевые тубы.
Маркировка	НД	В соответствии с ФС
Транспортировка	В соответствии с РД 9301-006-05749470-93	
Хранение	В хорошо укупоренной таре. В сухом, прохладном, защищенном от света месте, при температуре от 0 до +10 ⁰ С.	
Срок годности	2 года	

Описание. Твёрдые желатиновые капсулы №0. Корпус жёлтого цвета, крышечка тёмно-зелёного цвета. Содержимое капсулы – маслянистая жидкость без запаха и вкуса, допускается наличие нерастворенных частиц в виде белых вкраплений.

Подлинность.

Инфракрасный спектр фитопрепарата в области от 4000 до 400 см⁻¹ по положению полос поглощения должен соответствовать спектрам стандартных образцов бетулоновой кислоты, диацетата бетулина и их комплексов с тимолом.

Анализ методом обращено-фазовой жидкостной хроматографии проводится одновременно с количественным определением. Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора фитопрепарата должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартных образцов бетулоновой кислоты, диацетата бетулина, α- и γ-токоферола (при условиях, указанных для каждого конкретного вещества в разделе «Количественное определение»).

На хроматограмме испытуемого раствора должны регистрироваться пики метиловых эфиров жирных кислот: олеиновой с временем удерживания около 21 мин, линолевой с временем удерживания около 23.5 мин, линоленовой около 25 и 26 мин (в зависимости от присутствующих изомеров).

Бетулоновая кислота и диацетат бетулина, реагируя с ванилином в концентрированной серной кислоте, образует малиновое окрашивание.

2.0 г фитопрепарата помещают в мерную колбу на 100 мл, прибавляют 30 мл гексана, растворяют. Доводят объем раствора до метки тем же растворителем. Спектр поглощения раствора в ультрафиолетовой области должен иметь 2 максимума поглощения при длинах волн 424 и 434 нм.

Масса содержимого.

Средняя масса содержимого должна быть от 0,18 до 0,22 г.

Определение проводят на двадцати капсулах. Взвешивают капсулу с содержимым, затем извлекают из капсулы содержимое, промывают гексаном, высушивают и вновь взвешивают. По разности находят массу содержимого капсулы.

Количественное определение. Около 2,0 г (точная навеска) фитопрепарата помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, добавляют 0,5 г тимола, 0,2 г аскорбиновой кислоты, при перемешивании добавляют 50 мл этанола. После полного растворения к смеси добавляют 30 мл 60 масс.% водного раствора КОН. Образец нагревают с обратным холодильником при 70°C в течение 30 мин, периодически перемешивая. Затем смесь охлаждают до комнатной температуры, количественно переносят в делительную воронку, добавляют 100 мл воды очищенной (при этом смесь гомогенизируется). Экстракцию полученного раствора проводят гексаном (2 x 100 мл), на каждом этапе смесь взбалтывают в течение не менее 1 минуты. Гексановые фракции объединяют и обрабатывают 1% раствором аскорбиновой кислоты (100 мл). После этого экстракт промывают водой порциями по 100 мл до отсутствия щелочной реакции промывных вод. Раствор фильтруют через бумажный фильтр, содержащий 8 г натрия сульфата безводного, в колбу для отгона. Фильтр промывают гексаном (2 x 10 мл), сливая в ту же колбу. Гексан выпаривают в токе азота до остаточного объема 15 мл, затем это количество пропускают через колонку, заполненную MgO для хроматографии, диаметром 1,5 см, высотой 5 см. Колонку промывают гексаном (2 x 25 мл) и полученную объединенную гексановую фракцию отгоняют в токе азота досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл элюента (метанол – ацетонитрил –

дихлорметан 50:44:6). Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм.

Возможна корректировка ПФ для выполнения теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматограммы стандартных и испытуемого растворов регистрируют трижды.

Содержание бетулоновой кислоты, диацетата бетулина, α - и γ -токоферола рассчитывается программой LCsolution по данным линейной калибровочной функции производной от трёх стандартных растворов. Вычисления основаны на измерении площадей пиков.

Условия хроматографирования производных бетулина:

- металлическая колонка, заполненная C_{18} с диаметром частиц 5 мкм (250 x 4.6 мм), например, Supelco;
- подвижная фаза (ПФ) – смесь ацетонитрил : вода (90 : 10, об. %);
- объем вводимой пробы – 20 мкл;
- скорость потока ПФ – 1,0 мл/мин;
- детектор – диодно-матричный УФ детектор, 196 нм и 210 нм;
- температура колонки - 40 °С.

Содержание бетулоновой кислоты и диацетата бетулина должно быть в течение срока годности от 0,45 до 0,55 % каждый.

Условия хроматографирования токоферолов:

- металлическая колонка, заполненная C_{18} с диаметром частиц 5 мкм (250 x 4.6 мм), например, Supelco;
- подвижная фаза (ПФ) – смесь метанол : ацетонитрил : дихлорметан (50 : 44 : 6, об. %);
- объем вводимой пробы – 20 мкл;
- скорость потока ПФ – 1,0 мл/мин;
- детектор – диодно-матричный УФ детектор, 284 нм;
- температура колонки - 30 °С.

Содержание α -токоферола в фитопрепарате должно быть не менее 5,63 мг%,
 γ -токоферола – не менее 4,33 мг%

Результаты считаются достоверными, если выполняется требование теста
«Проверка пригодности хроматографической системы».

Примечание. 1. Приготовление растворов стандартных образцов α - и γ -токоферолов. Около 0,05 г (точная навеска) стандартных образцов α - и γ -токоферолов помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, прибавляют по 50 мл смеси метанол:ацетонитрил:дихлорометан (50:44:6), растворяют при перемешивании и доводят тем же растворителем до меток. Отбирают по 5 мл полученных растворов и переносят в мерные колбы вместимостью 50 мл, доводят растворителем до метки. От полученных растворов отбирают пробы для ввода в хроматограф. Растворы используют свежеприготовленными.

2. Приготовление раствора стандартного образца бетулоновой кислоты. Около 0,01 г (точная навеска) стандартного образца бетулоновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл смеси этанола 96 %, растворяют при перемешивании и доводят тем же растворителем до метки. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. Раствор используют свежеприготовленным.

3. Приготовление раствора стандартного образца диацетата бетулина. Около 0,01 г (точная навеска) субстанции диацетата бетулина помещают в

мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл этанола 96 %, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм. Раствор используют свежеприготовленным.

4. Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику диацетата бетулина, не менее 10000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пиков бетулоновой кислоты, диацетата бетулина, α - и γ -токоферола не более 2,0;
- коэффициент корреляции градуировочного графика для диацетата бетулина не менее 0,95;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное по площадям пиков диацетата бетулина, полученное для трех вводов стандартного раствора 2, составляет не более 2%.

Микробиологическая чистота. Испытание проводится в соответствии с требованиями ГФ XIII, Том 1, ОФС 1.2.4.0002.15.

Упаковка. По 10 капсул в контурную ячейковую упаковку из поливинилхлоридной пленки и фольги алюминиевой.

По 20, 50 или 100 капсул в контейнер полимерный для лекарственных средств, разрешенных к применению МЗ РФ. На контейнер наклеивается этикетка самоклеящаяся.

Один контейнер или 2, 5 или 10 контурных упаковок вместе с инструкцией по применению помещают в пачку из картона для потребительской тары по ГОСТ 7933-89.

Групповая и транспортная тара в соответствии с ГОСТ 17768-90.

Маркировка. На контурной ячейковой упаковке указывают производителя, адрес, название препарата на русском языке, количество, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности.

Транспортирование. В соответствии с РД 9301-006-05749470-93

Хранение. В хорошо укупоренной таре. В сухом, прохладном, защищенном от света месте, при температуре от 0 до +10⁰С.

Срок годности. 2 года.

Приложение 4. Акты внедрения

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по учебной работе
ГБОУ ВПО «НижГМА»
Минздрава России
д.м.н., профессор С.Н. Цыбусов
«21» декабря 2015 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации Лебедевой Регины Александровны на тему:
«Совершенствование синтеза и стандартизация производных бетулина как компонентов
гиполипидемического препарата» по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия,
фармакогнозия в учебную работу кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии
государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального
образования «Нижегородская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Комиссия в составе д.х.н., профессора, заведующего кафедрой
фармацевтической химии и фармакогнозии Мельниковой Н.Б., к.х.н., доцента
кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии Жильцовой О.Е., к.х.н.,
доцента кафедры общей химии Красильниковой Е.В. подтверждает
использование результатов, полученных Лебедевой Региной Александровной в
ходе работы над кандидатской диссертацией «Совершенствование синтеза и
стандартизация производных бетулина как компонентов гиполипидемического
препарата» в курсе обучения студентов III-V курсов фармацевтического
факультета на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии.

д.х.н., профессор, заведующий кафедрой
фармацевтической
химии и фармакогнозии

Н.Б. Мельникова

Н.Б. Мельникова

к.х.н., доцент кафедры
фармацевтической
химии и фармакогнозии

О.Е. Жильцова

О.Е. Жильцова

к.х.н., доцент кафедры
общей химии

Е.В. Красильникова

Е.В. Красильникова

603005, г. Нижний Новгород, ул. Минина 10/1

603005, г. Нижний Новгород, ул. Минина 10/1

«УТВЕРЖДАЮ»
 Заведующий структурным
 подразделением ГБОУ СПО НО
 «Нижегородский медицинский базовый колледж»,
 к.фарм.н., отличник здравоохранения РФ
 И.А. Пегова
 «21» декабря 2015 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации Лебедевой Регины Александровны на тему:
 «Совершенствование синтеза и стандартизация производных бетулина как компонентов
 гипополипидемического препарата» на соискание учёной степени кандидата фармацевтических
 наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в научно-
 исследовательскую работу фармацевтического отделения государственного
 образовательного учреждения среднего профессионального образования
 Нижегородской области «Нижегородский медицинский базовый колледж».

Комиссия в составе к.б.н., председателя цикловой методической комиссии
 Т.П. Зиминой; к.п.н., заслуженного учителя РФ, преподавателя Т.Н. Поповой и
 методиста Л.И. Страшной подтверждает использование результатов,
 полученных Лебедевой Региной Александровной в ходе работы над
 кандидатской диссертацией «Совершенствование синтеза и стандартизация
 производных бетулина как компонентов гипополипидемического препарата» в
 научно-исследовательской и учебной работе фармацевтического отделения
 ГБОУ СПО НО «Нижегородский медицинский базовый колледж».

к.б.н., председатель цикловой
 методической комиссии

Т.П.Зиминая

к.п.н., заслуженный учитель РФ,
 преподаватель

Т.Н. Попова

методист

Л.И. Страшнова

603011, г. Нижний Новгород, ул. Ильинская, д. 20



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ГАУЗ НОЦККСЛС,

к.фарм.н.

И.В. Спицкая

«21» декабря 2015 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации Лебедевой Регины Александровны на тему: «Совершенствование синтеза и стандартизация производных бетулина как компонентов гипополипидемического препарата» на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в государственном автономном учреждении здравоохранения Нижегородской области «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств».

Комиссия в составе директора, к.фарм.н., И.В. Спицкой; начальника испытательной лаборатории Е.В. Митрофановой подтверждает использование результатов, полученных Лебедевой Региной Александровной в ходе работы над кандидатской диссертацией «Совершенствование синтеза и стандартизация производных бетулина как компонентов гипополипидемического препарата» в государственном автономном учреждении здравоохранения Нижегородской области «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств» (603141, г. Нижний Новгород, ул. Геологов, д. 6, тел. (831) 466-70-55, e-mail: nockksls@sandy.ru) в виде:

1. Методики качественного и количественного анализа производных бетулина методами ИК-спектроскопии и ОФ-ВЭЖХ используются в системе мониторинга качества лекарственных средств;
2. Данные проекта ФСП на гипополипидемический препарат «Бетулитим» используются в полном объеме.

Ответственные за внедрение:

Директор, к.фарм.н.

И.В. Спицкая

Начальник испытательной лаборатории

Е.В. Митрофанова

603141, г. Нижний Новгород, ул. Геологов, д. 6