

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н. И. Лобачевского»

Химический факультет

Кафедра органической химии

**РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТИВНЫХ МЕТОДИК ПОЛУЧЕНИЯ
ФОСФАТСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕТУЛИНА
С УЛУЧШЕННОЙ РАСТВОРИМОСТЬЮ В ВОДЕ**

Выпускная квалификационная работа

Исполнитель:
Студент 4–го курса
Очной формы обучения
Степашин Иван Евгеньевич

Научные руководители:
Зав. кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии
ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава РФ,
д. х. н., профессор Мельникова Нина Борисовна

Д. х. н., профессор
кафедры органической химии
ФГАОУ ВО «НИУ ННГУ им. Н. И. Лобачевского»
Гущин Алексей Владимирович

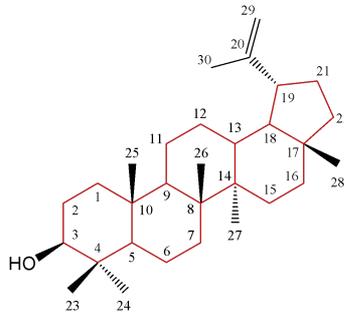
Нижегород

2018

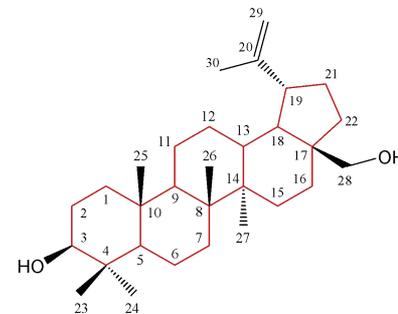
АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

Бетулин и его производные, выделяемые из растительного сырья, обладают рядом ценных фармакологически активных свойств:

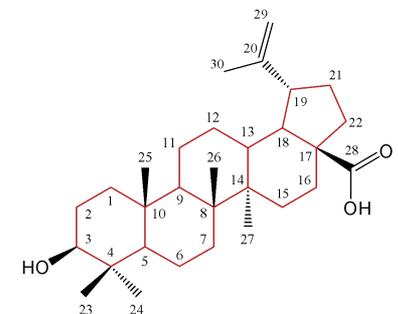
- 1 Онкопротекторными;
- 2 Гепатопротекторными;
- 3 Антивирусными;
- 4 Противоспалительными;
- 5 Антиоксидантными;
- 6 Иммуностимулирующим и др.



ЛУПЕОЛ



БЕТУЛИН



БЕТУЛИНОВАЯ
КИСЛОТА

Существенными преимуществами бетулина и его производных являются:

- 1 Очень низкая токсичность;
- 2 Возобновляемость природных ресурсов, являющихся наиболее предпочтительным источником бетулина и его производных.
- 3 Преимущество фосфатсодержащих производных бетулина: высокая растворимость в воде, и как следствие – высокая биодоступность и благоприятная биотрансформация (фосфатазы, киназы и др.) в организме человека.

СЛОЖНОСТЬ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ БЕТУЛИНА ОБУСЛОВЛЕНА РЯДОМ ФАКТОРОВ

1 Лабильность циклической структуры бетулина, состоящей из четырех шестичленных циклов в форме «кресла» и одного пятичленного цикла в форме «полукресла» (^{13}C - и ^1H -ЯМР-спектроскопия)

2 Склонность к изомеризации:

- внутримолекулярная миграция метильных групп и атомов водорода;
- смещение кратной связи $\text{C}-20=\text{C}-29 \rightarrow \text{C}-20=\text{C}-19 \rightarrow \text{C}-19=\text{C}-18$;
- эпимеризация (α - и β -эпимеры при атоме углерода C-3).

3 Способность к образованию устойчивых ассоциатов и комплексов включения;

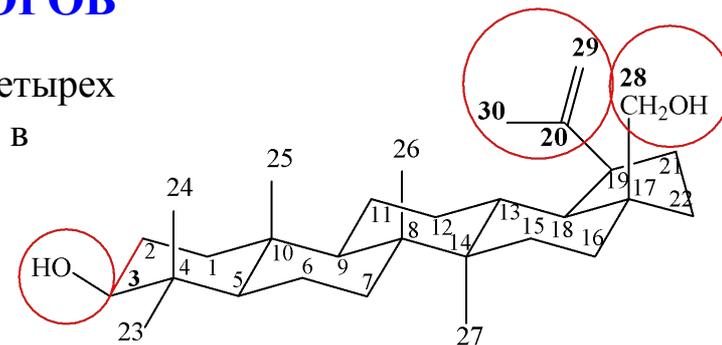
4 Способность к образованию структурных модификаций (явление полиморфизма);

5 Наличие в молекуле бетулина трёх реакционных центров:

- первичная спиртовая группа при углеродном атоме C-28;
- вторичная спиртовая группа при углеродном атоме C-3;
- кратная связь при $\text{C}-20=\text{C}-29$.

6 Низкая селективность фосфорилирования;

7 Чрезвычайно низкая растворимость бетулина и большинства его производных в воде.



БЕТУЛИН

ФОРМУЛИРОВКА ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ И ПОСТАНОВКА ОСНОВНЫХ ЗАДАЧ

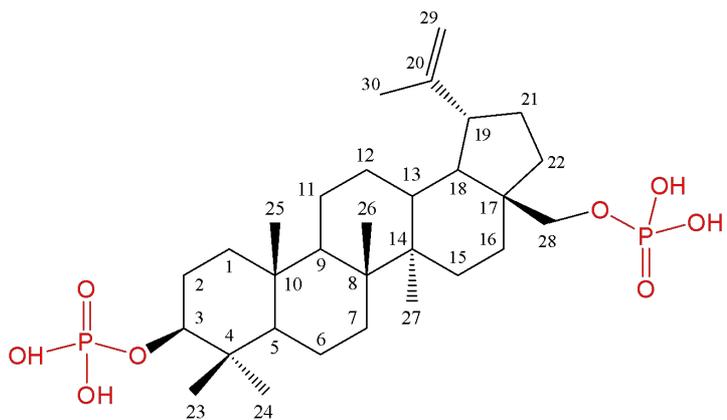
ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ:

Оптимизация синтеза 3β -фосфата аллобетулина и стабильных структурных модификаций $3\beta,28$ -дифосфата бетулина с **улучшенной растворимостью в воде.**

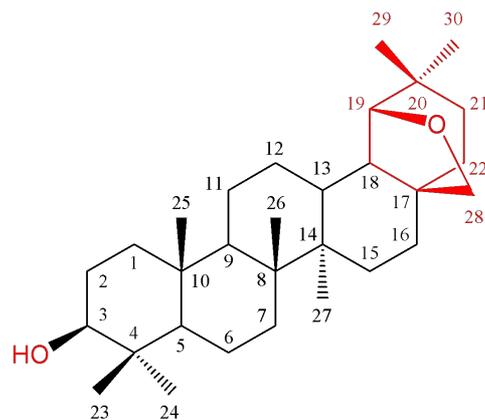
ЗАДАЧИ:

- 1 Модификация препаративного синтеза аллобетулина;
- 2 Разработка синтеза 3β -фосфата аллобетулина;
- 3 Оптимизация синтеза структурной модификации $3\beta,28$ -дифосфата бетулина с улучшенной растворимостью в воде;
- 4 Разработка методов стабилизации $3\beta,28$ -дифосфата бетулина в нужной структурной модификации.

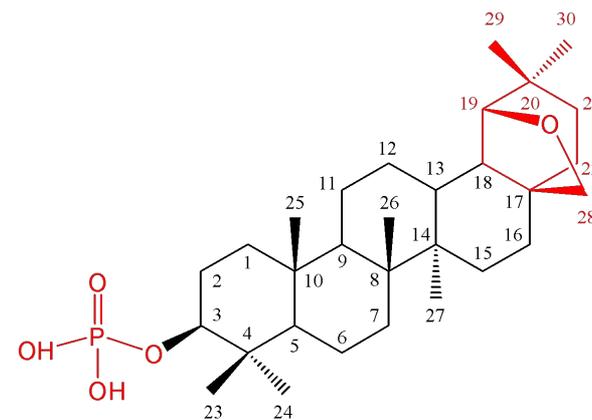
ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ



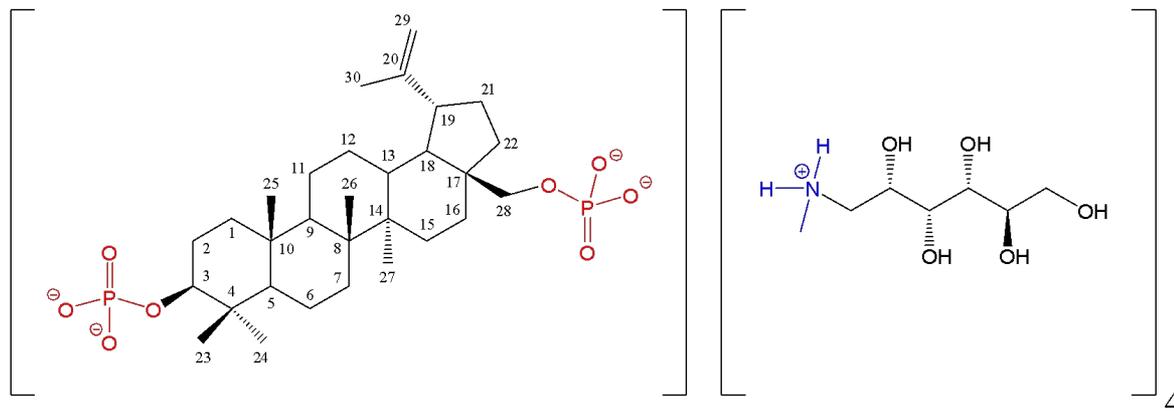
3β,28-ДИФОСФАТ БЕТУЛИНА



АЛЛОБЕТУЛИН

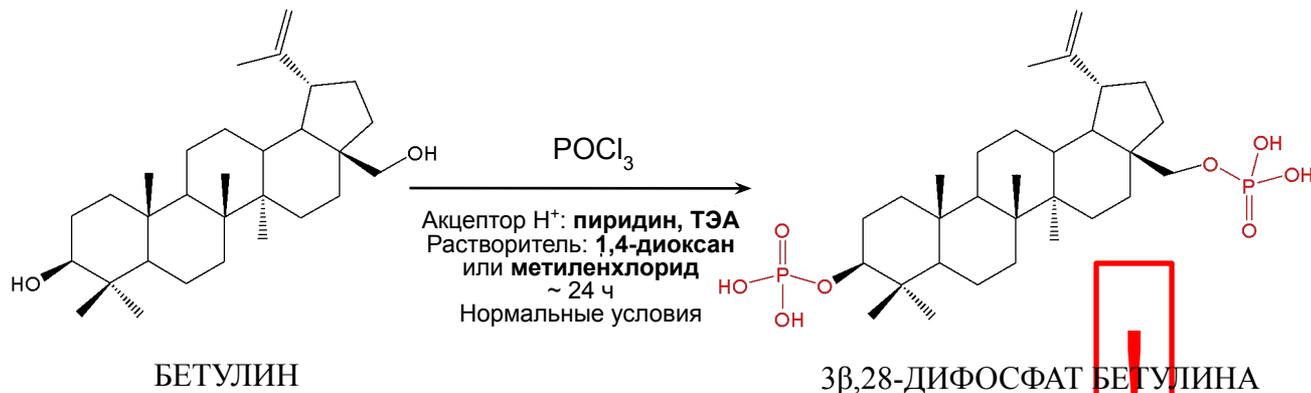


3β-ФОСФАТ АЛЛОБЕТУЛИНА



ИОННЫЙ КОМПЛЕКС 3β,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА С МЕГЛУМИНОМ

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕТУЛИНА В ПРИСУТСТВИИ АКЦЕПТОРА ПРОТОНОВ

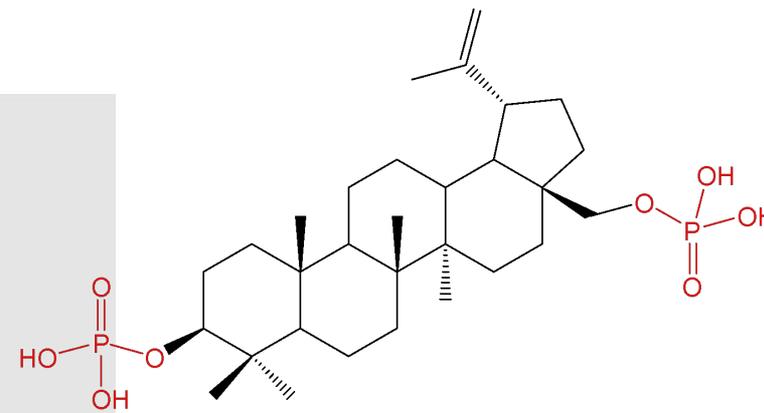
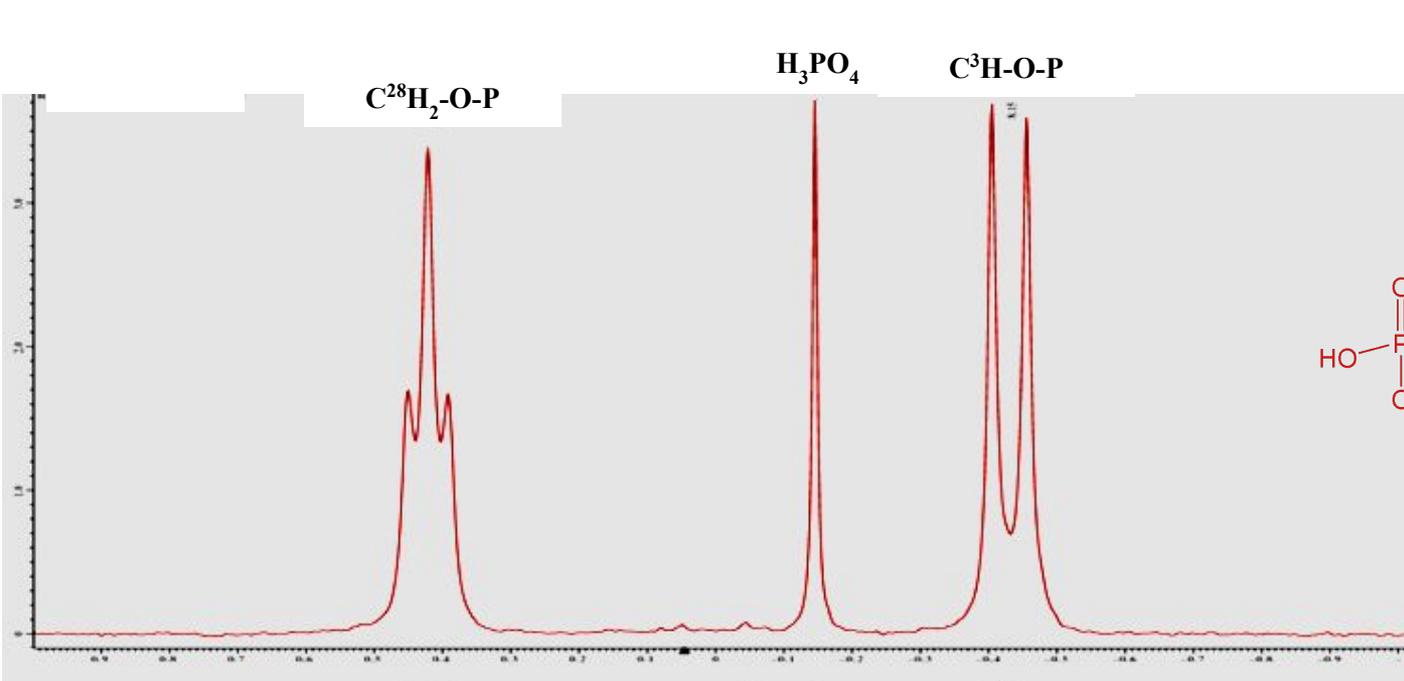


Акцептор H ⁺	Б : А : POCl ₃	Растворитель	Обработка	д., г.д.	P, %	Выход (ВЭЖХ), %
ТЭА	1 : 1 : 12	CH ₂ Cl ₂	удаление Sol, H ₂ O до pH 7	9,79*, 2,75*, 0,23; -0,68	8,31	50
ТЭА	1 : 2 : 12	1,4 – диоксан	удаление Sol, H ₂ O до pH 7	9,82*, 2,77*, 0,27; -0,61	8,45	45
Py	1 : 2 : 12	CH ₂ Cl ₂	удаление Sol, H ₂ O до pH 7	0,26; -0,63	10,12	75
Py	1 : 1 : 6	1,4 - диоксан	H ₂ O до pH 7	0,27; -0,64	10,05	75
Py	1 : 6 : 6	1,4 - диоксан	H₂O до pH 7**	0,25; -0,65	10,27	95
Py	1 : 6 : 6	1,4 - диоксан	P-ры NaCl, HCl, NaHCO ₃ , H ₂ O до pH 7**	0,31; -0,59	10,23	90

* 9,82; 9,79; 2,77; 2,75 – пиридиный-хлоридные комплексы **ОТКУДА ВЗЯЛСЯ ПИРИДИН!?**

** Предварительное удаление пиридиный-хлоридного комплекса с помощью фильтрации.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО СТРУКТУРЫ 3 β ,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА С ПОМОЩЬЮ ^{31}P -ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ



3 β ,28-ДИФОСФАТ
БЕТУЛИНА

ЯМР-спектрометр «Bruker AM500»
(Bruker Daltonik GmbH, Germany) в
Растворитель - DMSO-d₆;
Стандарт 1 – H₃PO₄;
Стандарт 2 – Ph₃P.

Фрагмент ^{31}P -ЯМР-спектра 3 β ,28-дифосфата бетулина

Дублет $\delta = -0.40$ м.д. – фосфатная группа при атоме С-3 бетулина ($^3J_{\text{H-P}} \sim 8$ Hz – CH-O-P);

Триплет $\delta = +0.48$ м.д. – фосфатная группа при атоме С-28 бетулина ($^3J_{\text{H-P}} \sim 4.6$ Hz – CH₂-O-P);

Синглет $\delta = -0.27$ м.д. – неорганический фосфат (стандарт 1);

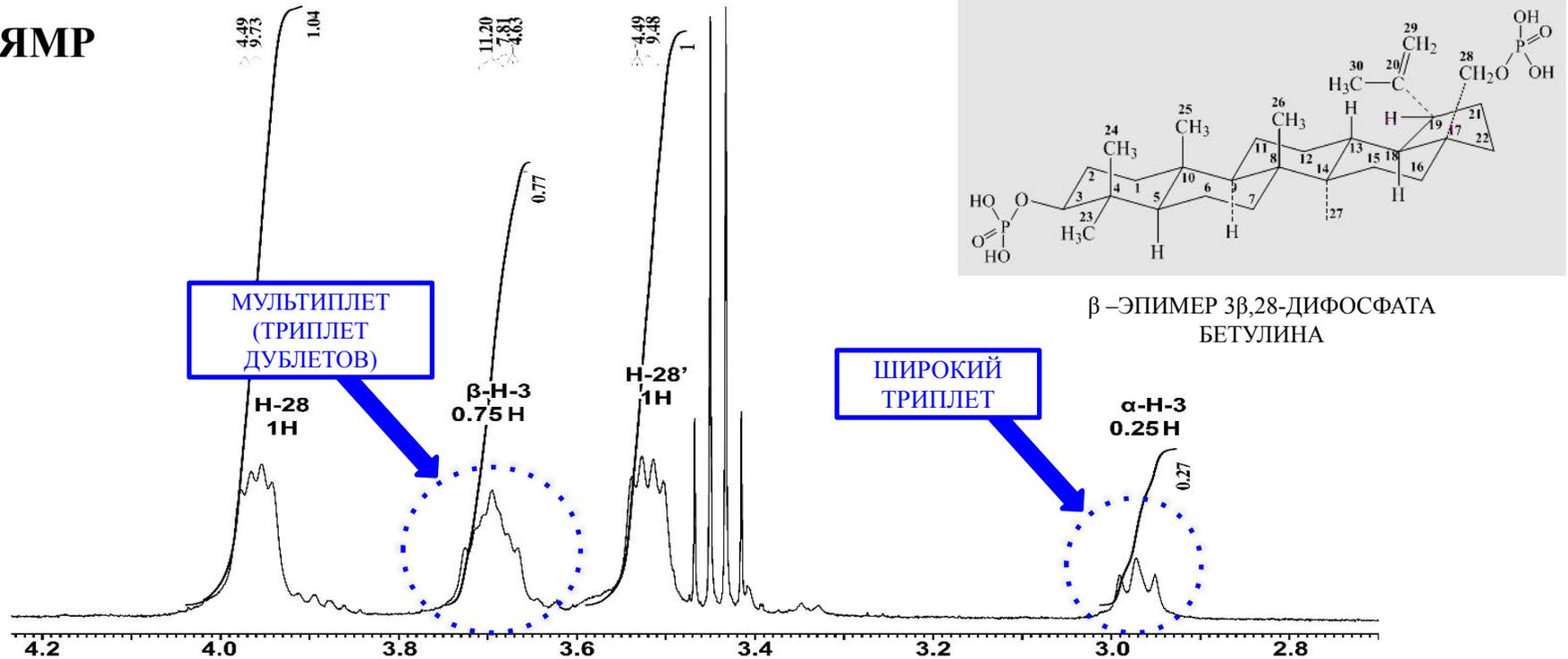
Мультиплет $\delta = -5.93$ м.д. - Ph₃P (стандарт 2) – отсутствует на представленном фрагменте ^{31}P -ЯМР-спектра 3 β ,28-дифосфата бетулина.

ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНЫХ МОДИФИКАЦИЙ 3 β ,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА

Параметр	Структурная модификация 3 β ,28-дифосфата бетулина	
	3 β ,28-ДФБ-1	3 β ,28-ДФБ-2
Растворимость в этаноле	До 10%	До 0,1%
T _{пл}	147-148°C	156-160°C
Экзо-эффект (ДСК)	$\Delta H_2 = -19,7 \pm 0,2$ кДж · моль ⁻¹	$\Delta H_2 = -70,5 \pm 0,7$ кДж · моль ⁻¹
ДТГ-кривая	2 ступени	1 ступень
Характеристика ИК-спектра	<p>ИК-спектры структурных модификаций 3β,28-ДФБ-1 и 3β,28-ДФБ-2 имеют существенные отличия в области «отпечатков пальцев», а также в области, отвечающей валентным колебаниям фосфорильных – P-O-H comb (2331, 2342 см⁻¹ широкая слабая полоса), P-O st, P=O st (1216-1196; 1100-940 см⁻¹), и гидроксильных групп – 3400-3300 см⁻¹.</p>	

ЭПИМЕРИЗАЦИЯ 3 β ,28-ДФБ

ЯМР: ^1H -ЯМР



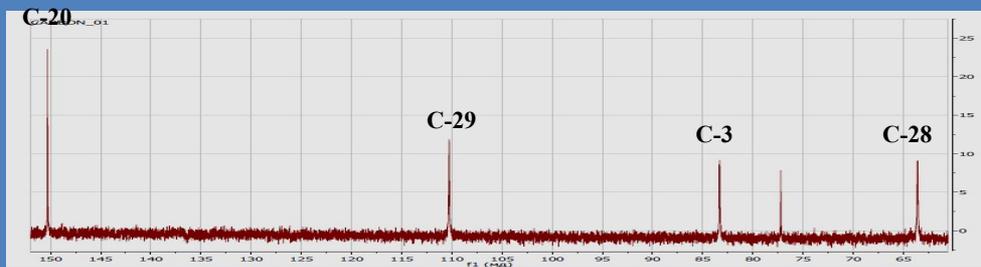
Фрагмент ^1H -ЯМР спектра 3 β , 28-ДФБ (DMSO- d_6 , стандарт TMS, 400 МГц).

δ 0.68-1.99 м.д. (42H, м, 6CH₃, (CH₂)₁₀, (CH)₄), 2.35-2.42 м.д. (1H, м, H-19), 2.97 м.д. (0.25H, шир. т, α -H-3, J = 7.7 Гц), 3.69 м.д. (0.75H, ддд, β -H-3 м J = 4.6, 7.8, 11.2 Гц), 3.96 м.д. (1H, дд, H-28, J = 9.7, 4.5 Гц) и 3.52 м.д. (H, дд, H-28', J = 9.5, 4.5 Гц), 4.55, 4.69 м.д. (2H, два с, H-29), 5.69 (протоны в фосфатных группах O-P(O)(OH)₂, шир. размытый с).

ЭПИМЕРИЗАЦИЯ 3 β ,28-ДФБ

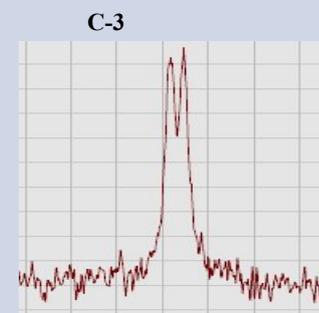
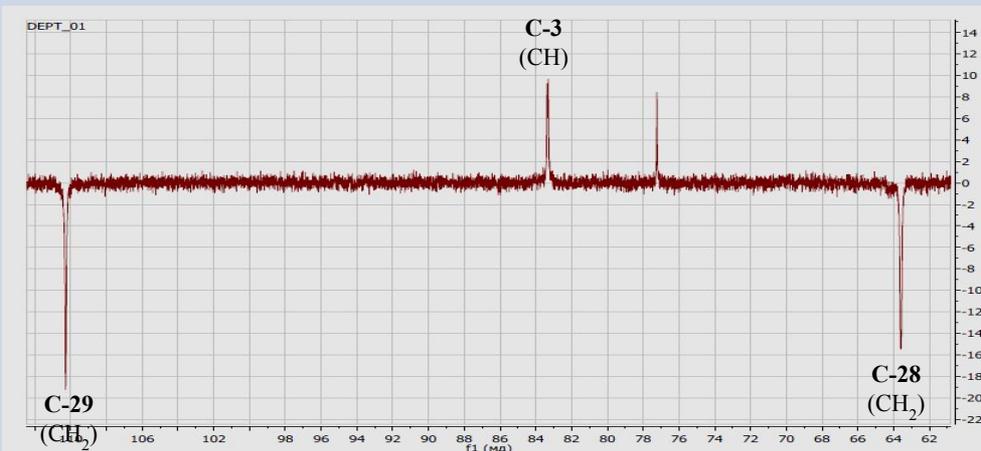
¹³C-ЯМР

¹³C-ЯМР-
спектр
3 β ,28-ДФБ



δ , м.д.:
63,57 (C-3);
150,2 (C-20);
83,31 (C-28);
110,27 (C-29).

¹³C-ЯМР-спектр
3 β ,28-ДФБ
(DEPT)



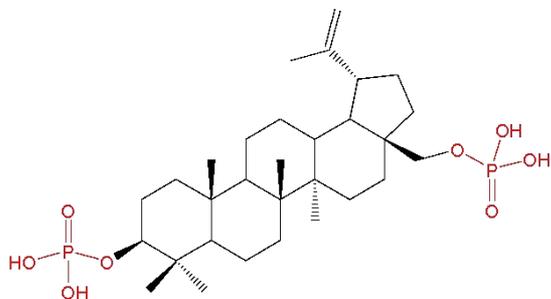
δ , м.д.:
63,61 (C-3);
83,31 (C-28);
110,28 (C-29).

Бетулин: ¹³C-ЯМР, δ , м.д.: 60,6 (C-3), 150,5 (C-20), 79,1 (C-28), 109,7 (C-29)

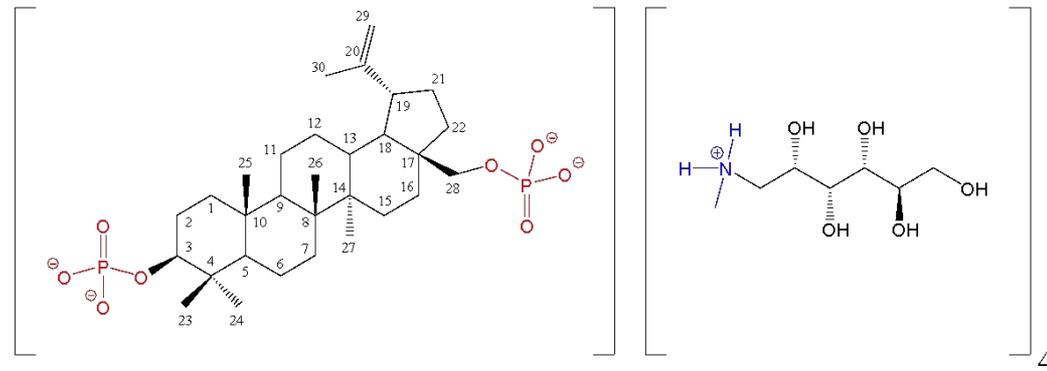
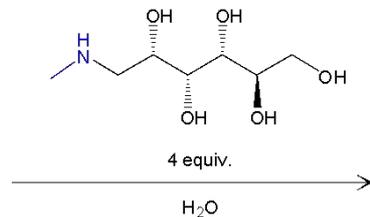
Растворитель: DMSO-d₆

Стандарт: TMS

ПОЛУЧЕНИЕ СОЛЕВЫХ КОМПЛЕКСОВ 3β,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА С МЕГЛУМИНОМ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ РАСТВОРИМОСТИ В ВОДЕ



3β,28-ДИФОСФАТ(V)
БЕТУЛИНА

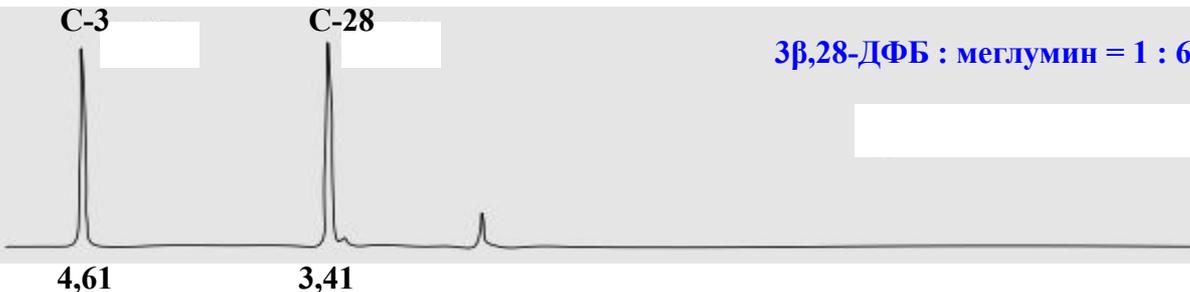
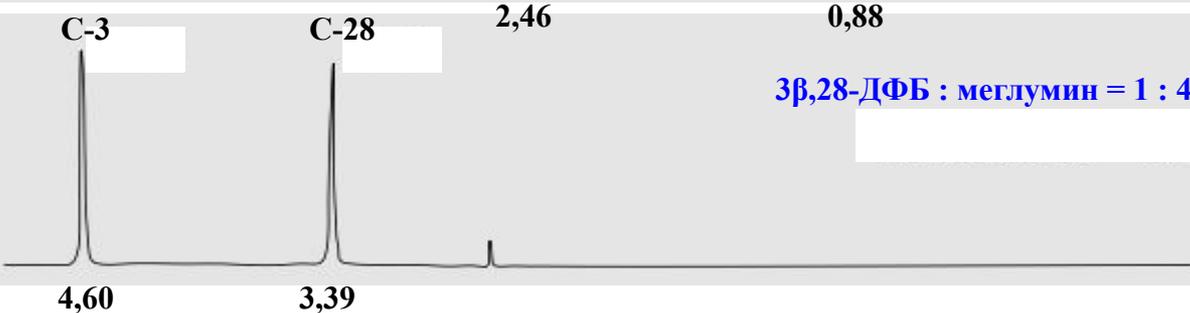
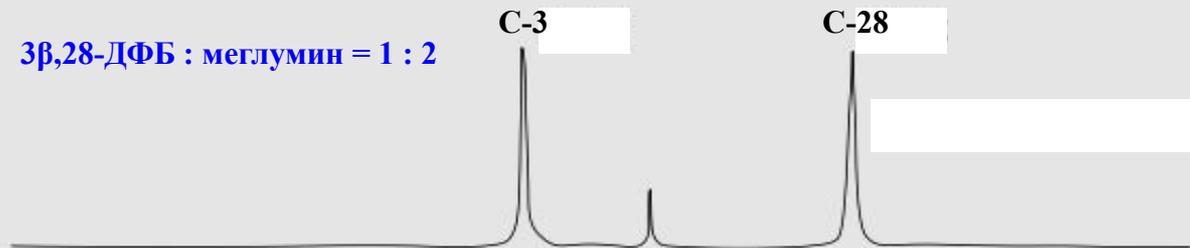


ИОННЫЙ КОМПЛЕКС
3β,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА С МЕГЛУМИНОМ

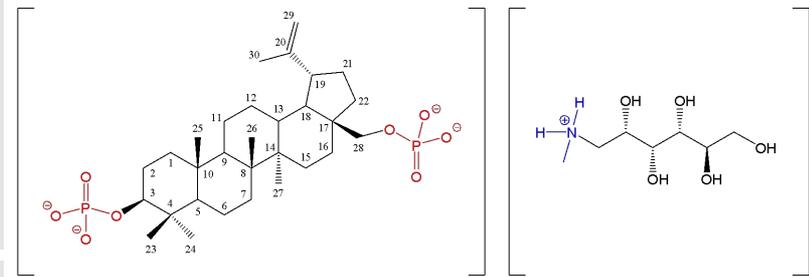
Вещество	Предельная концентрация, г/л
Бетулин	1·10 ⁻⁶ г/л
3β,28-ДФБ-1	1·10 ⁻² г/л
ионный комплекс 3β,28-ДФБ · меглумин (1:4)	До 60 г/л
Na ₄ – 3,28-ДФБ	1 г/л
Na₄ – 3,28-ДФБ · nH₂O	1 – 10 г/л

ИССЛЕДОВАНИЕ СОЛЕВОГО КОМПЛЕКСА 3β,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА С МЕГЛУМИНОМ С ПОМОЩЬЮ ³¹P-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

3β,28-ДФБ : меглумин = 1 : 2



5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5 δ, м.д.



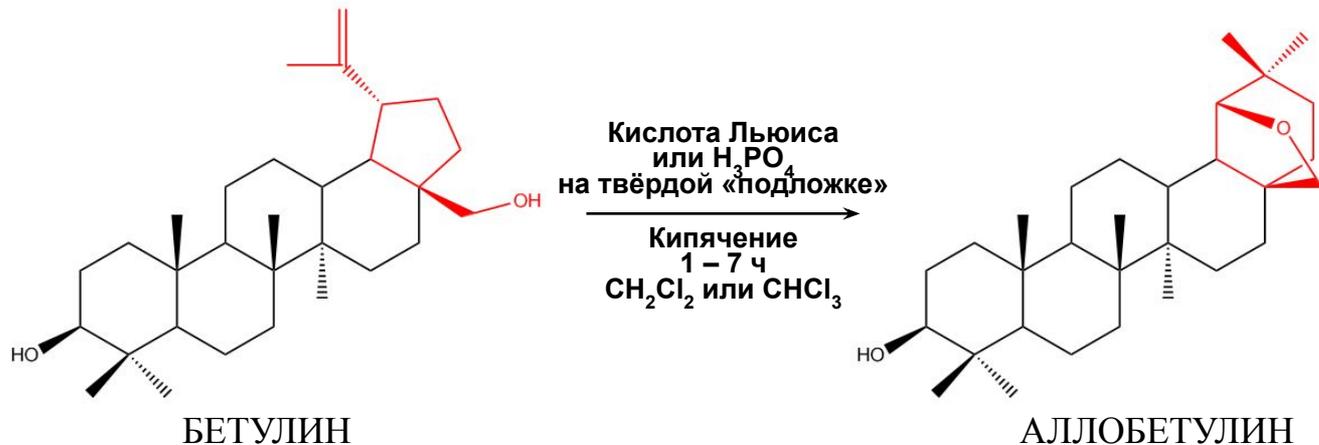
ИОННЫЙ КОМПЛЕКС
3β,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА С МЕГЛУМИНОМ (1 : 4)

Данные ³¹P-ЯМР-спектров ионных комплексов
3β,28-ДФБ с меглумином

3β, 28-ДФБ: Меглумин	δ, м.д.	
	С-3, τ	С-28, д
1 : 2	2,46	0,88
1 : 4	4,60	3,39
1 : 6	4,61	3,41

Растворитель – D₂O, стандарт – H₃PO₄

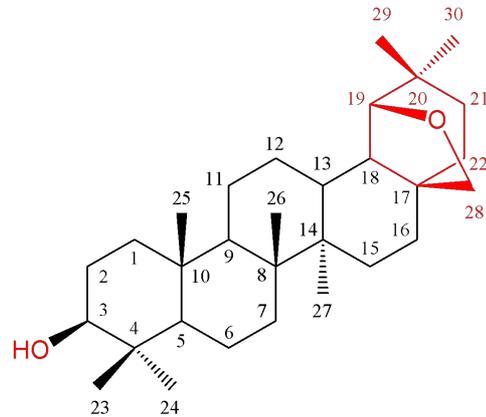
ИЗОМЕРИЗАЦИЯ БЕТУЛИНА В УСЛОВИЯХ МЕЖФАЗНОГО КИСЛОТНОГО КАТАЛИЗА



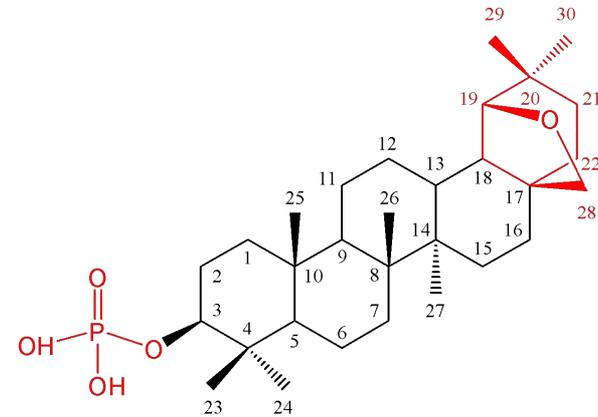
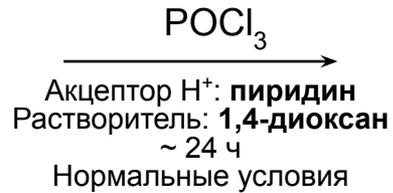
Кислотный катализатор	Твердофазный носитель	Растворитель	ТСХ (Г : ЭА = 10:1), R_f , % (Г – <i>n</i> -гексан; Э – этилацетат)	Выход аллобетулина (ВЭЖС), % _{масс.}
H_3PO_4 (концентрированная)	$\text{C}_{\text{акт}}$	<i>n</i> -бутанол	0,06 (Бт); 0,13 (АБт); 0,21; 0,83	71
$\text{FeCl}_3 \cdot (6+n) \text{H}_2\text{O}$	SiO_2	CH_2Cl_2	0,13 (АБт); 0,21; 0,83	89
$\text{FeCl}_3 \cdot (6+n) \text{H}_2\text{O}$	SiO_2	CHCl_3	0,13 (АБт); 0,21; 0,83	94
AlCl_3	SiO_2	CHCl_3	0,06 (Бт); 0,13 (АБт); 0,21; 0,83	91

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ АЛЛОБЕТУЛИНА

Фосфорилирование аллобетулина проводилось в присутствии акцептора протонов - пиридина



АЛЛОБЕТУЛИН

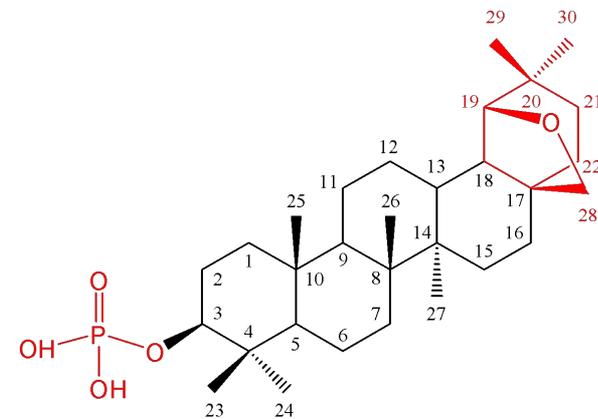
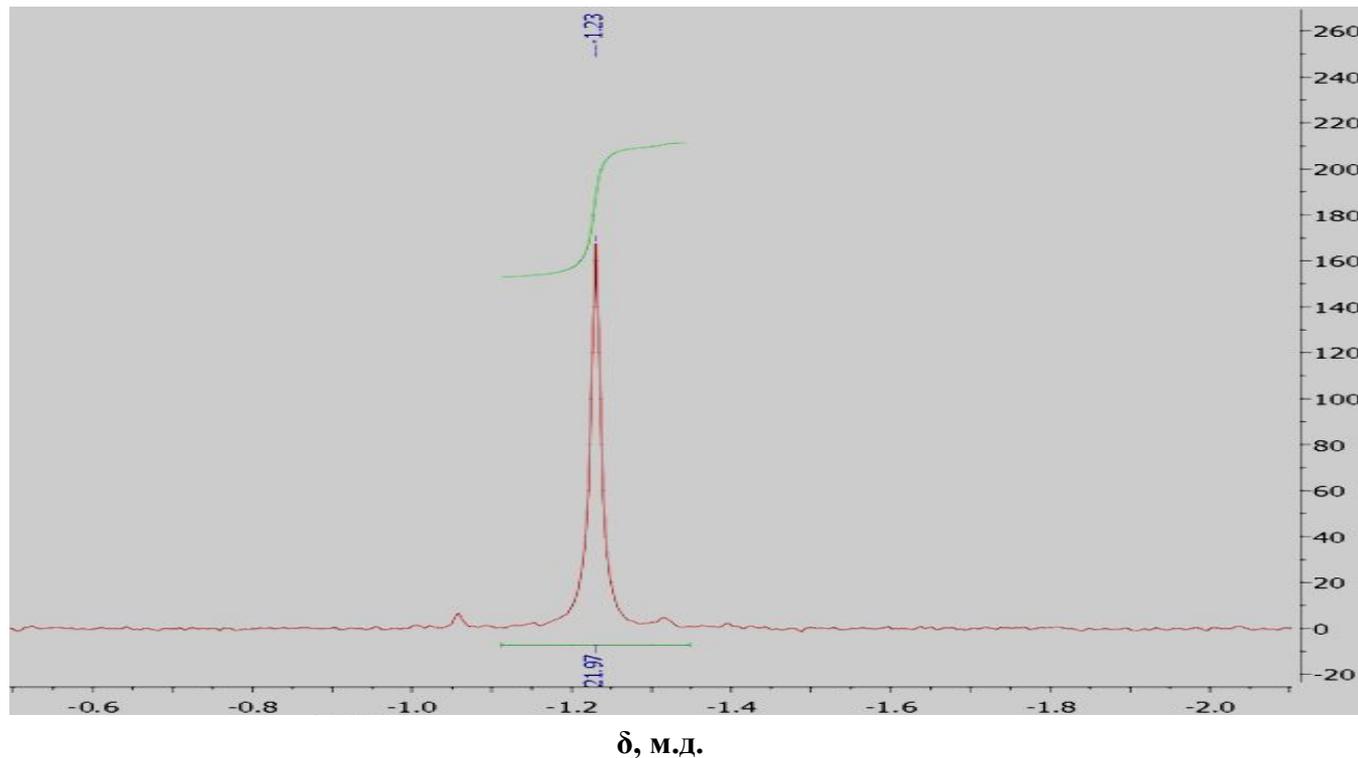


3β-ФОСФАТ АЛЛОБЕТУЛИНА

Акцептор H ⁺	Аллобетулин : А : POCl ₃	Растворитель	Обработка синтеза	³¹ P-ЯМР, δ, м.д.	P, %	Выход (ВЭЖХ), % _{масс.}
Py	1 : 1 : 6	1,4 – диоксан	H ₂ O до pH 7; центрифугирование гелеобразного осадка. Высушивание из ацетона	-1,23	5,74	89
Py	1 : 1,3 : 6	1,4 – диоксан	H ₂ O до pH 7	-	1,12	14
Py	1 : 3 : 6	1,4 – диоксан	H ₂ O до pH 7	-	0,95	9

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО СТРУКТУРЫ 3 β -ФОСФАТА АЛЛОБЕТУЛИНА

³¹P-ЯМР



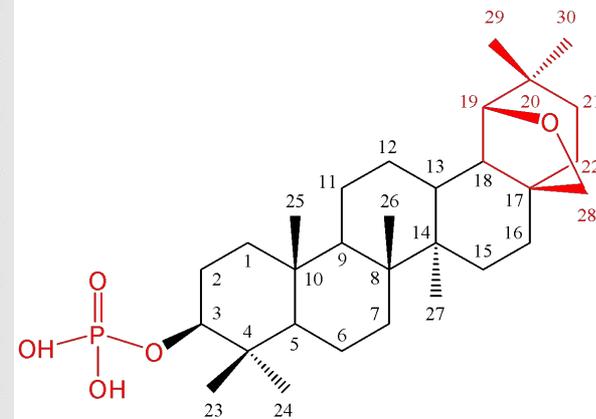
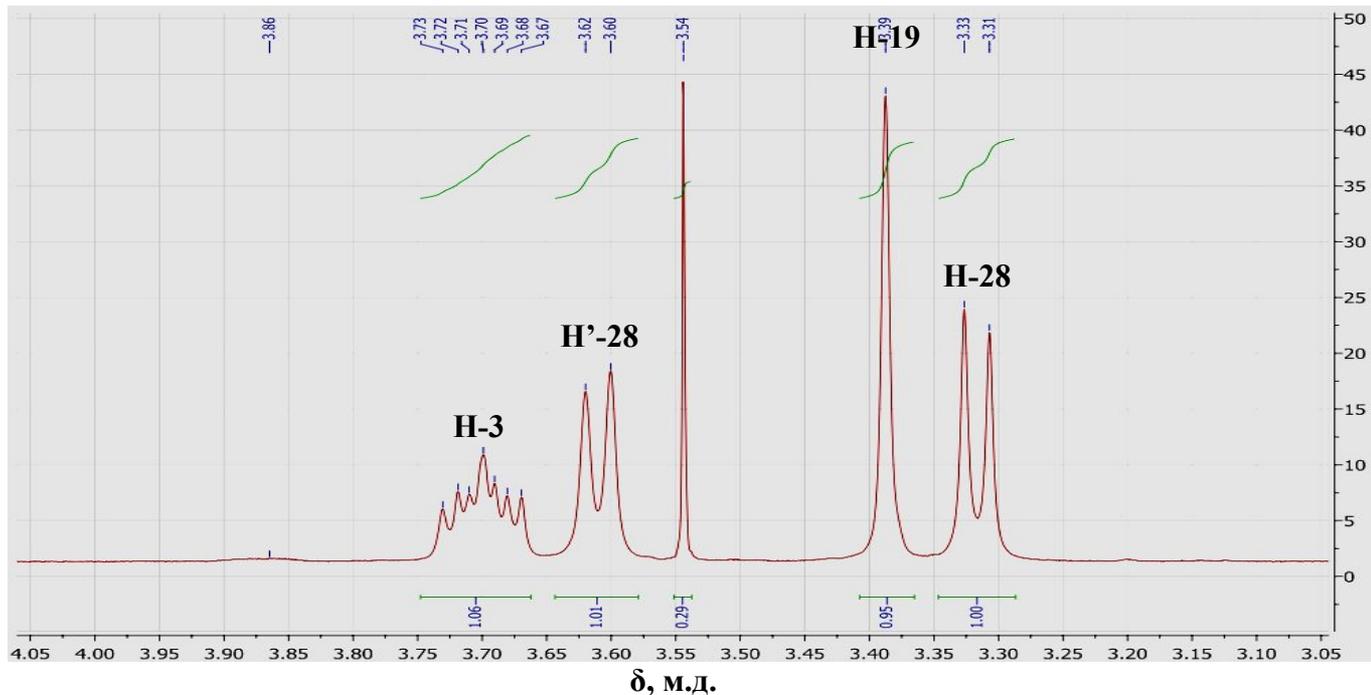
3 β -ФОСФАТ АЛЛОБЕТУЛИНА

ЯМР-спектрометр «Bruker AM500»
(Bruker Daltonik GmbH, Germany) в
DMSO-d₆, стандарт – Ph₃P

Мультиплет (предположительно неразрешенный дублет) $\delta = -1.23$ м.д. – фосфатная группа при атоме C ^{β} -3 аллобетулина.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО СТРУКТУРЫ β -ФОСФАТА АЛЛОБЕТУЛИНА

^1H -ЯМР



β -ФОСФАТ АЛЛОБЕТУЛИНА

ЯМР-спектрометр «Bruker AM500» (Bruker Daltonik GmbH, Germany) в DMSO-d₆, стандарт – Ph₃P

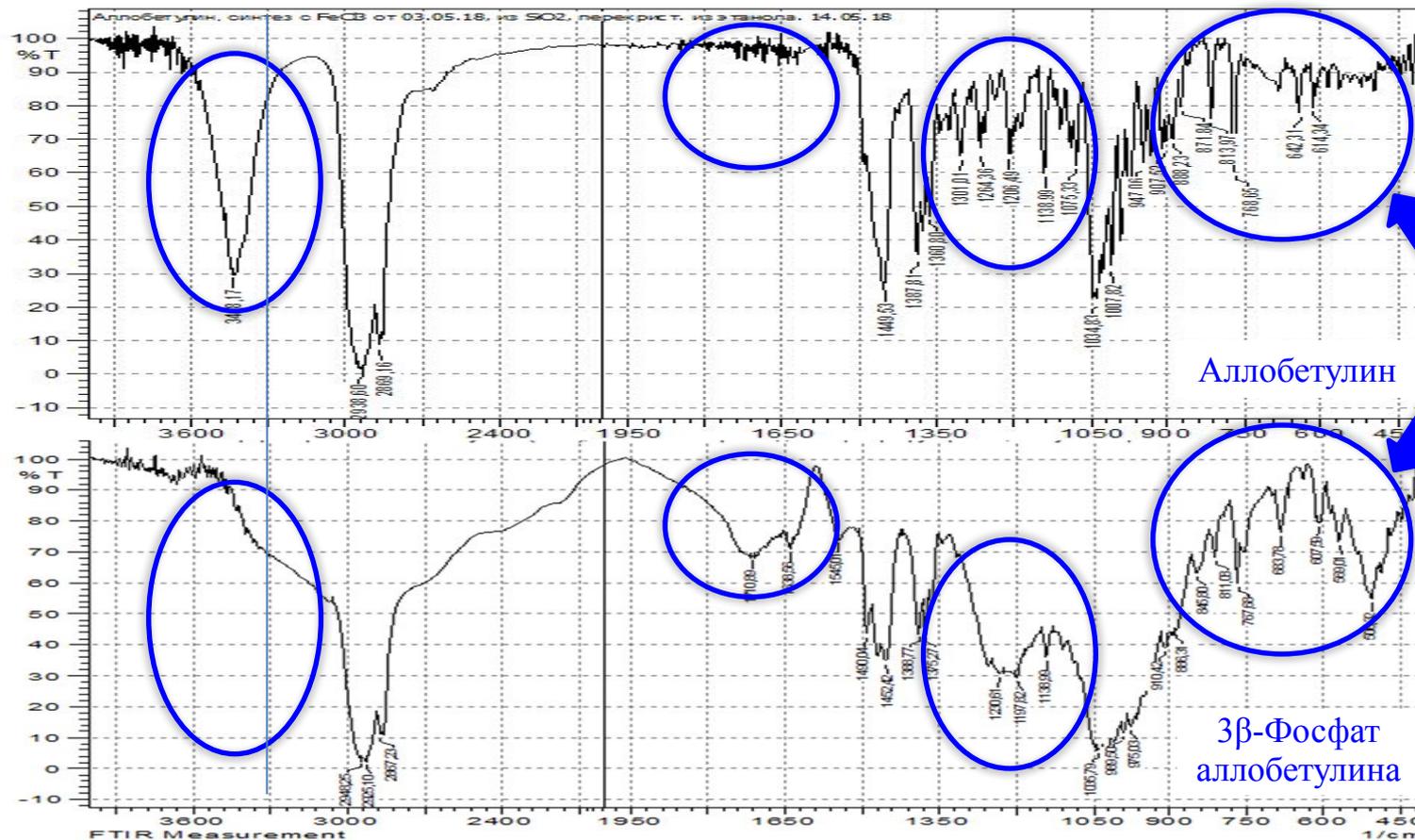
Фрагмент ^1H -ЯМР спектра β -фосфата аллобетулина (DMSO-d₆, стандарт TMS, 400 МГц).

δ 0,75 - 1,03 м.д. (6с, 21H, 7CH₃); 1,20-1,90 м.д. (м, 24H, CH₂, CH); **3,67-3,73 м.д. (м, 1H, H-3)**; 3,32 м.д. (д, 1H, H-28); 3,61 м.д. (д, 1H, H'-28); 3,39 м.д. (с, 1H, H-19).

Сравнительные данные ^1H -ЯМР-спектра аллобетулина (CDCl₃, стандарт TMS, 400 МГц).

δ 0,75 м.д. - 1,03 (6с, 21H, 7CH₃); 1,20-1,90 м.д. (м, CH₂, CH); **3,22 м.д. (м, 1H, H-3)**; 3,49 м.д. (д, 1H, H-28); 3,76 м.д. (д, 1H, H'-28); 3,53 м.д. (с, 1H, H-19).

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО СТРУКТУРЫ 3-ФОСФАТА АЛЛОБЕТУЛИНА С ПОМОЩЬЮ КОЛЕБАТЕЛЬНОЙ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ



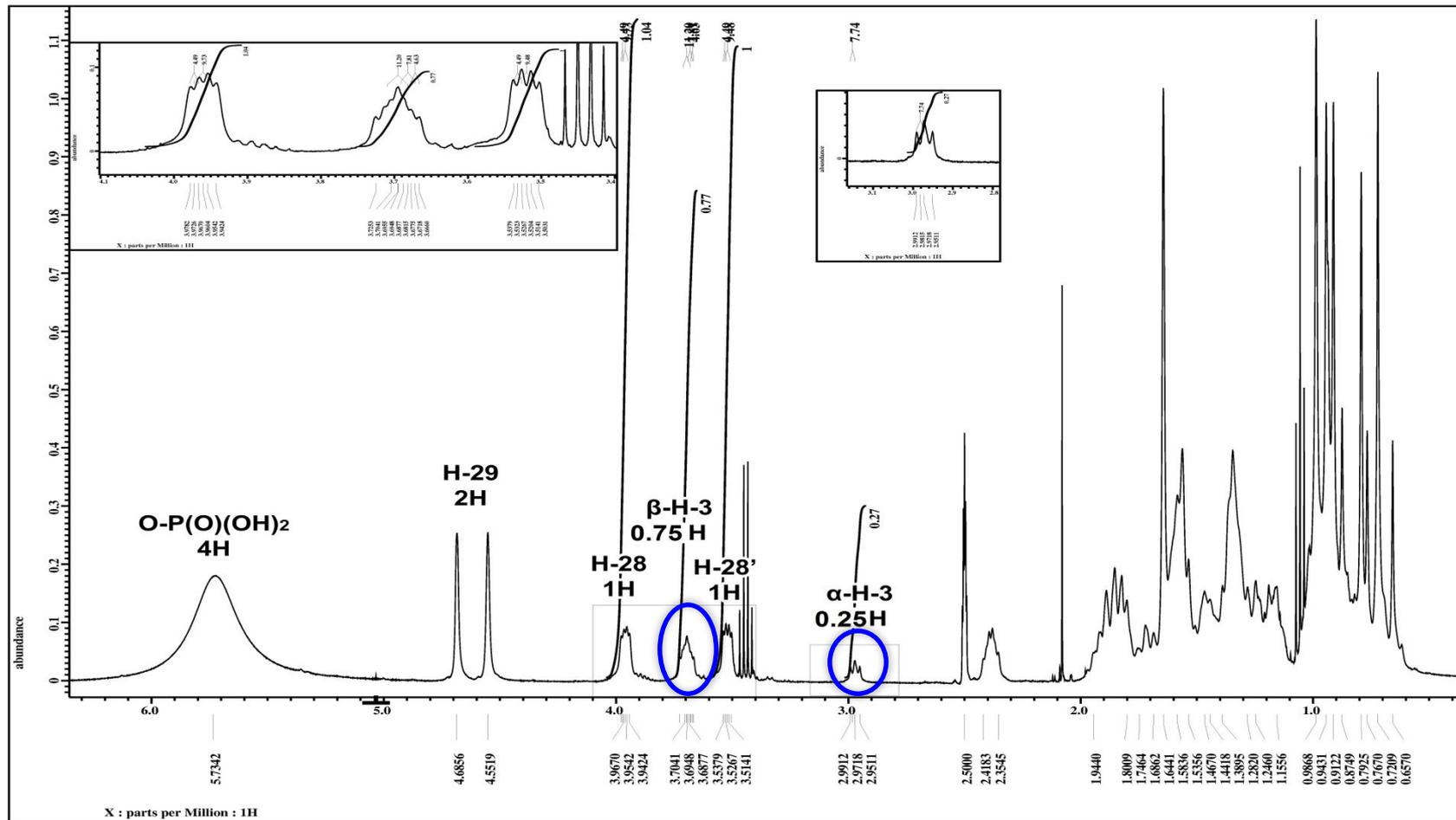
ИК-спектры аллобетулина и 3-фосфата аллобетулина отличались в области «отпечатков пальцев» ($890\text{--}400\text{ см}^{-1}$), а также в области, соответствующей валентным колебаниям **фосфорильных** – **P-O st**, **P=O st** ($1800\text{--}1580$; $1290\text{--}1190\text{ см}^{-1}$), и гидроксильных – **OH st** ($3400\text{--}3300\text{ см}^{-1}$) групп.

ВЫВОДЫ

- 1** Предложен синтез аллобетулина изомеризацией бетулина в условиях межфазного катализа кислотой Льюиса, импрегнированной на силикагель.
- 2** Разработан синтез 3 β -фосфата аллобетулина путем фосфорилирования аллобетулина оксихлоридом фосфора с последующим гидролизом фосфодихлоридного производного;
- 3** Модифицирована препаративная методика получения онкопротекторного соединения – 3 β ,28-дифосфата бетулина, в виде структурной модификации 1, растворимость в воде которой практически в десять раз больше, чем у структурной модификации 2;
- 4** Предложены методы стабилизации 3 β ,28-дифосфата бетулина в нужной структурной модификации. Показано, что оптимальной стабильной формой 3 β ,28-дифосфата бетулина является его двойная соль с меглумином, растворимость которой в воде увеличивается в 600 раз по сравнению с исходным 3 β ,28-дифосфатом бетулина и в $60 \cdot 10^6$ раз по сравнению с исходным бетулином!

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!

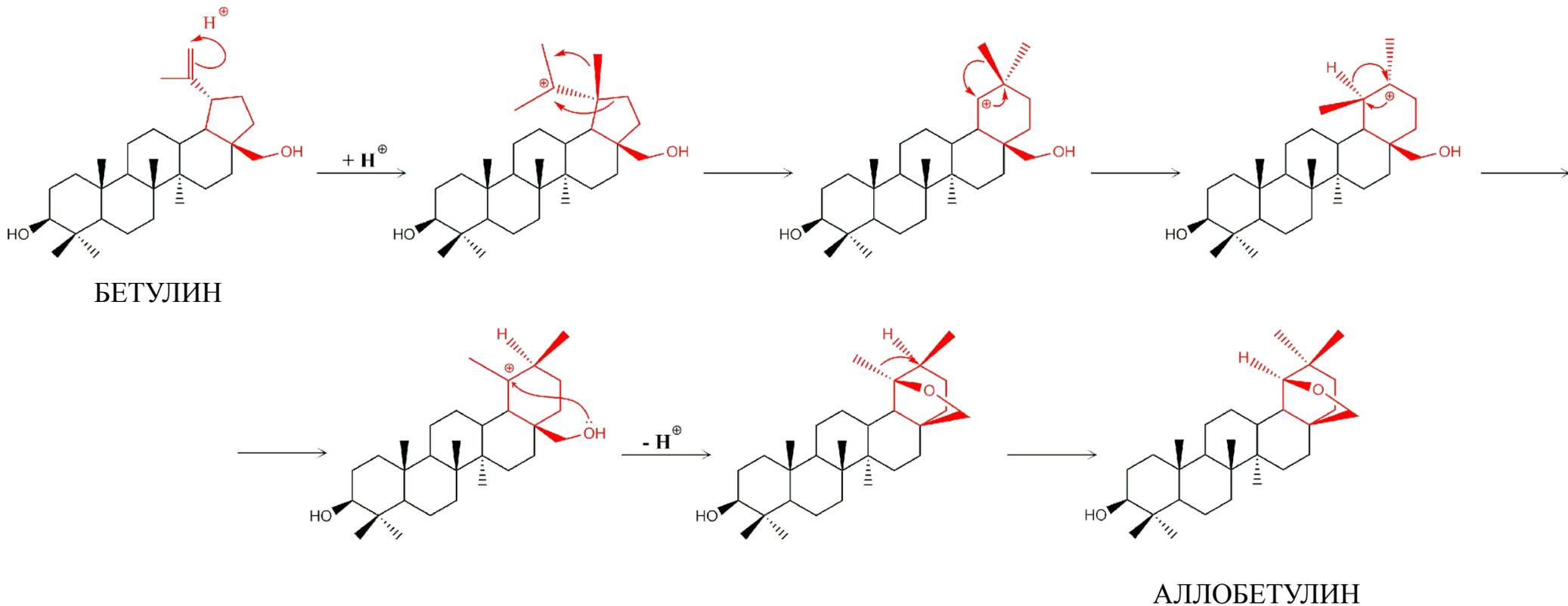
БЛАГОДАРНОСТЬ



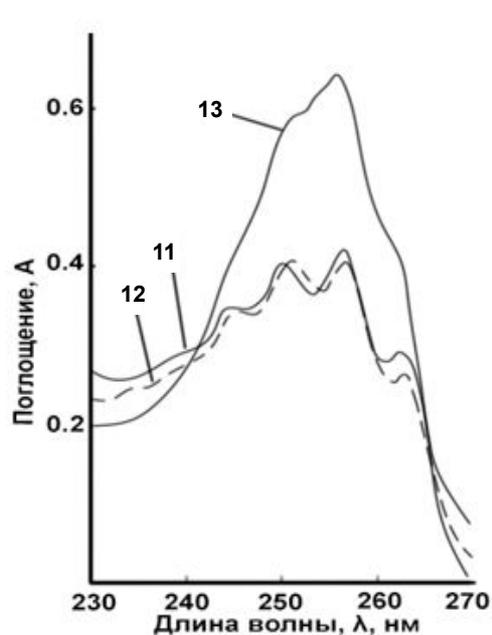
¹H-ЯМР-спектр 3β, 28-ДФБ (DMSO-d₆, стандарт TMS, 400 МГц).

δ 0.68-1.99 м.д. (42H, м, 6CH₃, (CH₂)₁₀, (CH)₄), 2.35-2.42 м.д. (1H, м, H-19), 2.97 м.д. (0.25H, шир. т, α-H-3, J = 7.7 Гц), 3.69 м.д. (0.75H, ддд, β-H-3, м J = 4.6, 7.8, 11.2 Гц), 3.96 м.д. (1H, дд, H-28, J = 9.7, 4.5 Гц) и 3.52 м.д. (H, дд, H-28', J = 9.5, 4.5 Гц), 4.55, 4.69 м.д. (2H, два с, H-29), 5.69 (протоны в фосфатных группах O-P(O)(OH)₂, шир. размытый с).

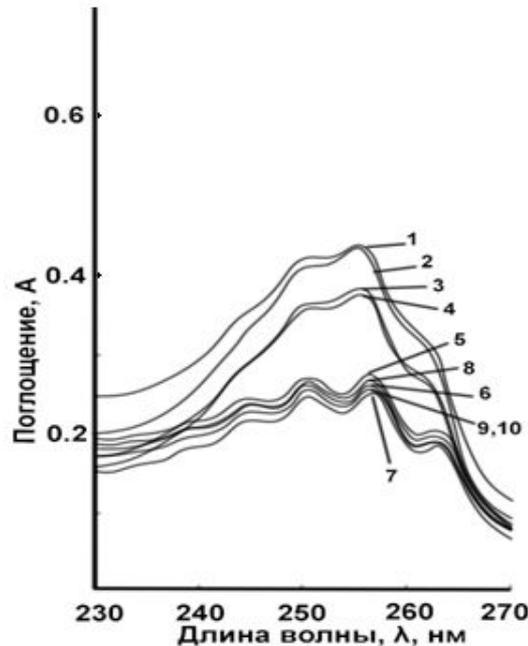
МЕХАНИЗМ ИЗОМЕРИЗАЦИИ БЕТУЛИНА В УСЛОВИЯХ КИСЛОТНОГО КАТАЛИЗА



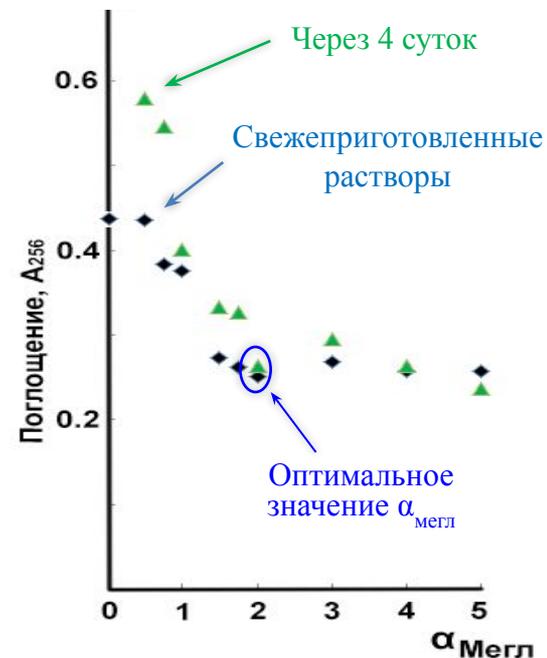
ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ХИМИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ 3 β ,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА С МЕГЛУМИНОМ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОЙ УФ-СПЕКТРОСКОПИИ



(a)



(б)



(в)

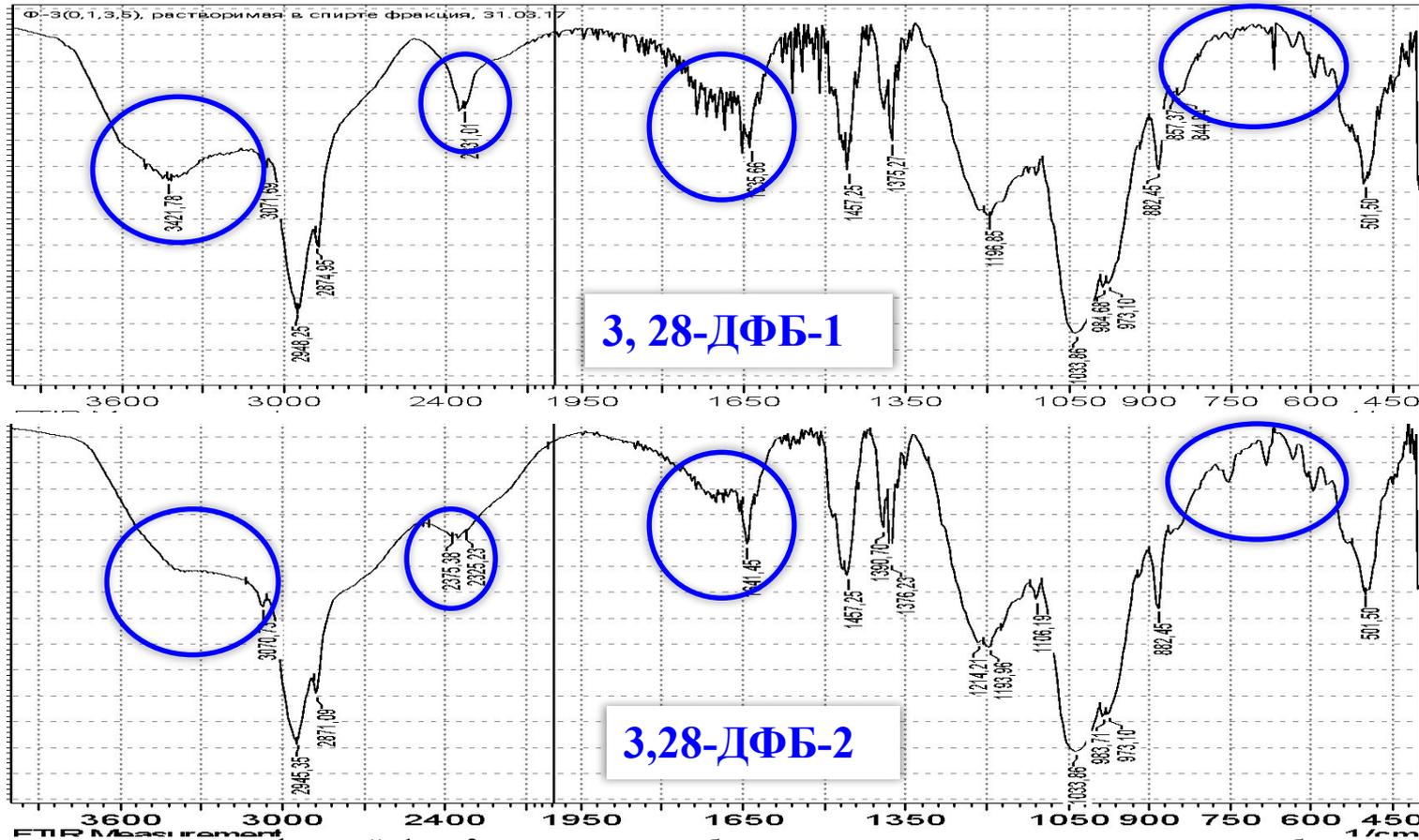
УФ-спектры **3 β ,28-ДФБ** в различных средах:

а) в 95% этаноле (**11**); в $4,0 \cdot 10^{-3}$ М водном растворе NaOH (**12**); в 0,02М этанольном растворе H₂SO₄ (**13**). $C_{3\beta,28\text{-ДФБ}} = 1,0 \cdot 10^{-3}$ М.

б) в водных растворах с меглумином $C_{3\beta,28\text{-ДФБ}} = 5,0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{\text{LiClO}_4} = 1,0 \cdot 10^{-2}$ М;

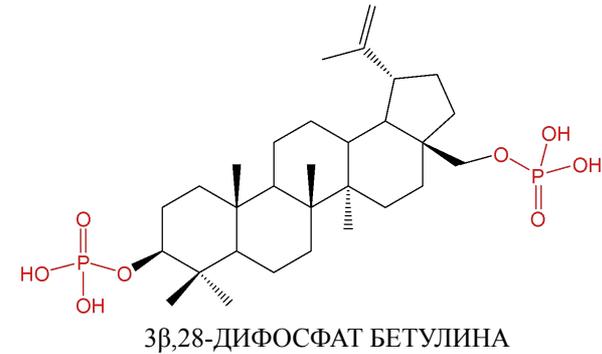
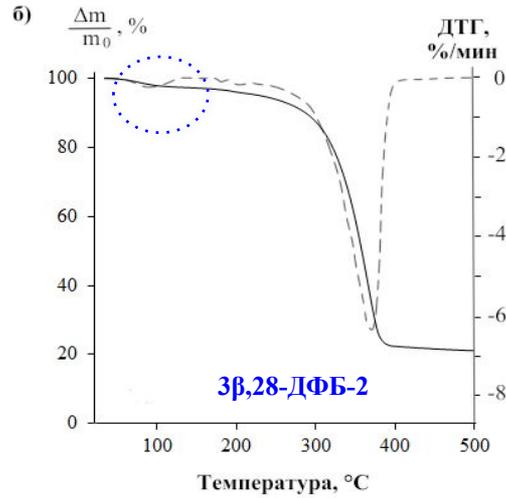
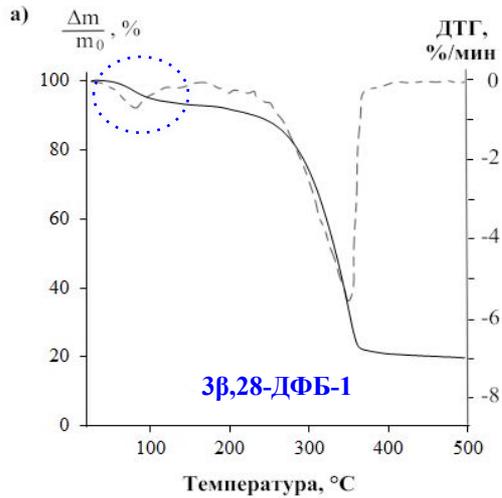
в) зависимость поглощения A_{256} от молярного соотношения меглумина к 3 β ,28-ДФБ, $A = f(\alpha_{\text{Мегл}})$, $\alpha_{\text{Мегл}} = n_{\text{Мегл}} / n_{3\beta,28\text{-ДФБ}}$ (оптимум при $\alpha_{\text{Мегл}} = 2$).

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ МОДИФИКАЦИЙ 3β,28-ДФБ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ КОЛЕБАТЕЛЬНОЙ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ



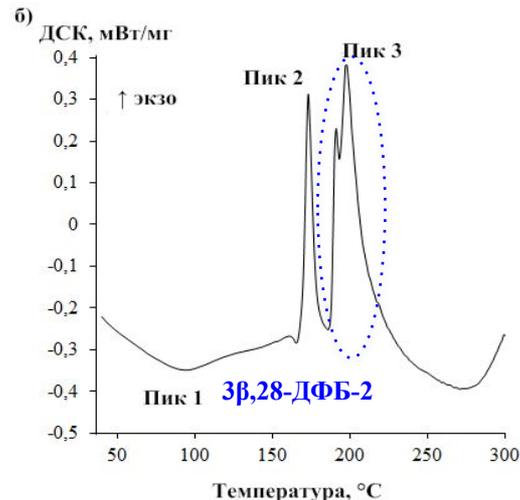
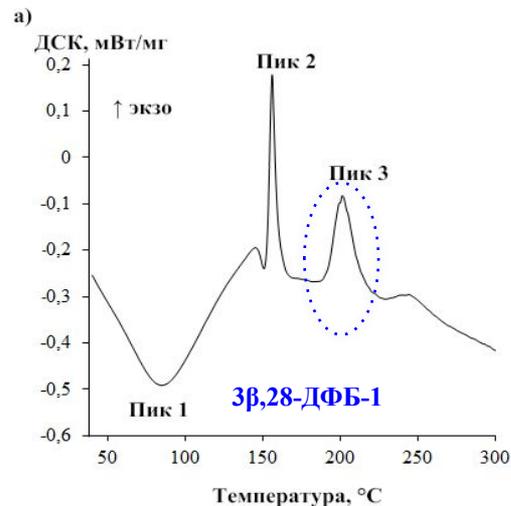
ИК-спектры структурных модификаций 1 и 2 отличались в области «отпечатков пальцев», а также в области, отвечающей валентным колебаниям фосфорильных – **P-O-H comb** (2331, 2342 cm^{-1} широкая слабая полоса), **P-O st**, **P=O st** (1216-1196; 1100-940 cm^{-1}), и гидроксильных групп – 3400-3300 cm^{-1} .

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ МОДИФИКАЦИЙ 3β,28-ДФБ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ТЕРМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА



Термоаналитические характеристики образцов 3β,28-ДФБ

Параметр	3β,28-ДФБ-1	3β,28-ДФБ-2
$T_{пл}$	147-148°C	156-160°C
Экзо-эффект (ДСК)	$\Delta H_2 = -19,7 \pm 0,2 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$	$\Delta H_2 = -70,5 \pm 0,7 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$
ТГ	2 степени	1 степень
Растворимость в этаноле	До 10%	До 0,1%



Свойства 3β,28-ДФБ (T_{tr} , растворимость, характеристики ИК-спектра и термоаналитические характеристики (данные ДТГ и ДСК)) зависят от его структурной модификации.