

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ПРИВОЛЖСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

МАЛЫГИНА ДАРИНА СЕРГЕЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ, ПОЛУЧЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ
ФОСФАТСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕТУЛИНА**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

Мельникова Нина Борисовна

доктор химических наук, профессор

Нижний Новгород – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ПРОИЗВОДНЫЕ БЕТУЛИНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	12
1.1. Основные виды биологической активности производных бетулина и бетулиновой кислоты	12
1.1.1. Противоопухолевая активность бетулина, бетулиновой кислоты и их производных	12
1.1.2. Противовирусная активность бетулиновой кислоты и ее производных	18
1.1.3. Другие виды активности бетулиновой кислоты и ее производных	21
1.2. Структура и физико-химические свойства производных бетулина и бетулиновой кислоты	25
1.3. Приемы увеличения растворимости производных бетулина и бетулиновой кислоты	32
1.3.1. Коллоидно-химические подходы улучшения биодоступности тритерпеноидов.....	32
1.3.2. Повышение растворимости путем химической модификации бетулина, бетулиновой кислоты и их производных	35
Выводы по Главе 1	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	42
2.1. Объекты, материалы и методы исследования	42
2.2. Выделение и идентификация бетулина	44
2.3. Методика получения 3,28-дифосфата бетулина.....	45
2.4. Метод электронной спектроскопии	46
2.4.1. Исследование комплексообразования 3,28-дифосфата бетулина с трисамином при постоянной концентрации 3,28-дифосфата бетулина.....	46
2.4.2. Исследование комплексообразования 3,28-дифосфата бетулина с трисамином методом изомолярных серий (Остромысленского-Жоба)	46
2.5. Метод спектрофотометрического определения общего фосфора	47
2.6. Исследования биологической активности	49
2.6.1. Исследования <i>in vitro</i>	49
2.6.2. Исследования <i>in vivo</i>	50
ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ НАТРИЕВОЙ СОЛИ И СОЛЕВЫХ КОМПЛЕКСОВ 3,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА.....	52
3.1. Получение и исследование физико-химических свойств натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина.....	52
3.1.1. Свойства структурных модификации 3,28-дифосфата бетулина	52

3.1.2. Получение натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина.....	61
3.2. Получение и свойства солевых комплексов 3,28-дифосфата бетулина с аминами (трисамин, ксимедон, меглумин)	69
3.2.1. Исследование кислотно-основных свойств 3,28-дифосфата бетулина УФ-спектральным методом.....	69
3.2.2. Исследование комплексообразования ДФБ с трисамином	72
3.2.3. Свойства солевых комплексов ДФБ с ксимедоном	81
3.2.4. Свойства солевых комплексов ДФБ с меглумином	89
Выводы по главе 3	94
ГЛАВА 4. СТАНДАРТИЗАЦИЯ НАТРИЕВОЙ СОЛИ 3,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА.....	96
4.1. Методики установления подлинности натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина	96
4.2. Количественное определение натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина.....	99
4.2.1. Количественное определение натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина методом ВЭЖХ	99
4.2.2. Количественное определение натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина по содержанию фосфора	105
4.3. Методики определения примесей натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина	109
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 3,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА В ВИДЕ ЕГО НАТРИЕВОЙ СОЛИ И СОЛЕВЫХ КОМПЛЕКСОВ С МЕГЛУМИНОМ	110
5.1. Оценка влияния натриевых солей 3,28-дифосфата бетулина и солевых комплексов 3,28-дифосфата бетулина с аминами на антиоксидантную ферментную защиту <i>in vitro</i> на крови крыс.....	110
5.2. Исследование противоопухолевой активности в комбинированной терапии с 5-фторурацилом и гидразина сульфатом на модели привитой асцитной карциномы Эрлиха на мышах	113
5.2.1. Влияние 3,28-дифосфата бетулина на лечение карциномы Эрлиха комбинированными препаратами	115
5.2.2. Влияние комбинированных препаратов 3,28-дифосфата бетулина на энергетический метаболизм и антиоксидантную защиту в эритроцитах.....	117
Выводы по главе 5	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	122
ВЫВОДЫ	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	125
ПРИЛОЖЕНИЯ	143
Приложение 1.....	144

Приложение 2.....	145
Приложение 3.....	146
Приложение 4.....	147
Приложение 5.....	148
Приложение 6.....	154

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия

АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха

Б – бетулин

БК – бетулоновая кислота

ГЖХ – газо-жидкостная хроматография

ДФБ – 3,28-дифосфат бетулина

ДМСО – диметилсульфоксид

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

Фурье-ИК – Фурье-инфракрасная спектроскопия

Кси – ксимедон

ЛВ – лекарственное вещество

ЛП – лекарственный препарат

ЛС – лекарственное средство

Мегл – меглумин

ОФ-ВЭЖХ – обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ТГ – термогравиметрический анализ

Трис – трисамин

УФ-спектроскопия – ультрафиолетовая спектроскопия

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

Na-ДФБ – натриевая соль 3,28-дифосфата бетулина

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Производные бетулина – бетулиновая и бетулоновая кислоты, сукцинаты, ацетаты и другие эфиры органических кислот, проявляют комплекс биологически активных свойств, таких как противоопухолевые, гиполипидемические, гепатопротекторные, противовирусные и другие [Falamas A., 2011; Król S.K., 2015]. Недостатками производных бетулина как потенциальных компонентов средств является их плохая растворимость (от 1 до 100 мкг/л) и, соответственно, низкая биодоступность.

Одним из путей решения этой проблемы является синтез их производных, содержащих сульфатные, сульфонатные, фосфатные и фосфонатные группы [9-14]. Производные фосфорной кислоты имеют преимущества, поскольку в организме человека они легко подвергаются биотрансформации под действием эндогенных фосфатаз, фосфорилаз и киназ плазмы крови и печени [Pradere U., 2014, Falamas A., 2011]. Органические фосфаты и фосфонаты, способные превращаться в лекарственные вещества в органе-мишени и выполнять функцию пролекарств, привлекают все большее внимание специалистов в области фармацевтической и медицинской химии [Pradere U., 2014]. Кроме того, эти соединения в виде солей существенно улучшают растворимость и, соответственно, биодоступность лекарственных веществ в организме человека. Так, например, дексаметазона фосфата натриевая соль, в отличие от исходного стероида, хорошо растворима в воде и в инъекционной форме проявляет более широкий спектр действия [Нао Н.Х., 2004].

Степень разработанности темы. В исследованиях *in vitro* фосфонаты бетулина - продукты модификации природного бетулина, выделенного из бересты березы, показали высокую эффективность по отношению к опухолям молочной железы (протоковая карцинома человека) и мозга (глиобластома человека), меланомы и пр. [Chrobak E., 2016].

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* продемонстрировано антибактериальное, антифунгальное, противовоспалительное, противовирусное действие 3,28-

дифосфата бетулина **ДФБ** [Красутский П.А., 2004]. Каплун А.П. и авторы показали способность **ДФБ** выступать ингибитором комплемента, регулирующим фактором многих системных заболеваний [Каплун А.П., 2004].

Несмотря на то, что методика получения **ДФБ** была модифицирована в работе Лебедевой Р.А., 2015 г., однако серьезные исследования растворимости и других свойств этого соединения не проводились. Наиболее перспективным путем улучшения растворимости является получение водорастворимых солей и солевых комплексов, в том числе комплексов с аминспиртами. В качестве гидрофильных аминспиртов – компонентов солевых комплексов, были выбраны ЛВ с антиацидозным действием (трисамин и меглумин), а также репарат с антиоксидантной активностью – ксимедон.

Цель исследования: Получение и исследование солей и солевых комплексов 3,28-дифосфата бетулина с улучшенной растворимостью.

Задачи исследования:

1. Получение и исследование свойств (растворимость, ИК, ЯМР, кристалличность структуры, теплофизическая характеристика) натриевой соли **ДФБ** (**Na-ДФБ**).
2. Исследование физико-химических и теплофизических свойств структурных модификаций **ДФБ**.
3. Разработка методов идентификации, количественного определения и стандартизация натриевой соли **ДФБ**.
4. Исследование взаимодействия **ДФБ** с трисамином в воде и изучение полученных комплексов в растворе.
5. Разработка методов улучшения растворимости **ДФБ** в воде за счет образования его солевых комплексов с меглумином и ксимедоном.
6. Оценка влияния биологической активности водорастворимых **Na-ДФБ** и солевых комплексов **ДФБ** с меглумином на процессы перекисного окисления липидов и на активность редокс-ферментов, а также на энергетический метаболизм в экспериментах *in vitro* на крови крыс.

7. Исследование противоопухолевого действия **Na-ДФБ** в комбинации с 5-фторурацилом и гидразина сульфатом с использованием привитой асцитной карциномы Эрлиха у мышей.

Научная новизна.

- Впервые выявлены показатели подлинности структурных модификаций **ДФБ**, отличающиеся по растворимости, температуре плавления, Фурье-ИК-спектрам и теплофизическим характеристикам.
- Впервые получена и охарактеризована структура кристаллической формы **Na-ДФБ** и разработаны методики его стандартизации.
- Впервые получены и исследованы солевые комплексы **ДФБ** с трисамином, меглумином и ксимедоном в воде. Показано улучшение растворимости в воде комплексов **ДФБ** с меглумином состава 1:4 до 59 г/л.
- Разработана фармацевтическая композиция **Na-ДФБ** и токсичных лекарственных веществ – гидразина сульфата и 5-фторурацила, проявляющая противоопухолевое действие по отношению к асцитной карциноме Эрлиха.

Новизна исследований подтверждена патентом Российской Федерации на изобретение № 2660649 «Способ получения соли 3,28-дифосфата бетулина».

Теоретическая и практическая значимость. Разработанные методики анализа структурных модификаций 3,28-дифосфата бетулина и его натриевой соли используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 02.04.2018 г., Приложение 2), на фармацевтическом отделении государственного бюджетного профессионального образовательного учреждения Нижегородской области «Нижегородский медицинский колледж» (акт внедрения от 16.04.2018 г., Приложение 3). Результаты по стандартизации фосфатсодержащих биологически активных веществ тритерпенового ряда, в том числе бетулиновых производных, используются в государственном автономном учреждении здравоохранения Нижегородской

области «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств» (акт внедрения от 18.04.2018 г., Приложение 4). Разработан проект фармакопейной статьи на фармацевтическую субстанцию 3,28-дифосфата бетулина.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО "ПИМУ" Минздрава России (номер государственной регистрации 01201063248) по научной проблеме «Исследование, получение и стандартизация фосфатсодержащих производных бетулина», РИД «Лекарственные препараты на основе природных тритерпенов и их производных».

Методология и методы исследования. При проведении исследования методологическую основу составили изучение и анализ работ отечественных и зарубежных ученых в области получения солей и солевых комплексов тритерпеноидов. При выполнении работ использованы современные методы органического синтеза, выделения и очистки полученных веществ. Строение и чистота полученных соединений установлены с помощью спектральных методов анализа: ИК-, УФ-, ЯМР-спектроскопии, ВЭЖ хроматографии, ТГ и ДСК термоаналитического анализа, порошковой рентгеновской дифрактометрии. Биологическую активность (противоопухолевую, антиоксидантную и воздействие на энергетический метаболизм) исследовали в *in vitro* и *in vivo* экспериментах на мышцах и крысах. Квантовохимические расчеты выполнены с использованием программы HyperChem (версия 8.0) полуэмпирическим методом AM1.

Положения, выносимые на защиту.

1. Методики получения, идентификации, количественного определения и стандартизации натриевой соли ДФБ.
2. Результаты получения и исследования солевого комплекса ДФБ бетулина с трисамином.
3. Результаты по исследованию взаимодействия ДФБ с меглумином и ксимедоном и выявлению условий достижения максимальной растворимости солевых комплексов в воде.

4. Результаты по исследованию антиоксидантной активности и энергетического метаболизма ДФБ и его солей в экспериментах *in vitro* на крови крыс.

5. Результаты экспериментального исследования противоопухолевого действия ДФБ в комбинации с гидразина сульфатом и 5-фторурацилом на модели привитой асцитной карциномы Эрлиха у мышей.

Достоверность научных положений и выводов базируется на достаточных по своему объему данных и количеству материала, современных методах исследования и статистической обработке данных.

Соответствие паспорту специальности. Работа соответствует паспорту специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» по следующим пунктам: 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»; 2 – «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств».

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на региональной конференции «XXII Нижегородская сессия молодых ученых» (г. Княгинино, 23 мая 2017 г.); XXIV Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты» (г. Новосибирск, 22 января 2016 г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной науки» (г. Уфа, 24 января 2015 г.).

Публикации. По материалам диссертации получен 1 патент, опубликованы 5 статей в ведущих рецензируемых отечественных и международных журналах, опубликованы доклады 3 конференций в форме тезисов.

Внедрение результатов исследования. Описанные в работе методы анализа фосфатсодержащих тритерпенов и обработки их результатов используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе на кафедре

фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО "ПИМУ" Минздрава России, в ГБПОУ НО «Нижегородский медицинский колледж», в ГАУЗ НОЦККСЛС.

Личный вклад автора. Результаты, приведённые в диссертации, получены при непосредственном участии автора в проведении физико-химических и биологических исследований 3,28-дифосфата бетулина и его натриевой соли в комбинации с гидразина сульфатом и 5-фторурацилом в фармацевтической композиции. Автор является основным исполнителем написания публикаций по теме диссертации и разработке нормативной документации на субстанцию натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной методам и объектам исследования, трех глав собственных исследований, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 162 страницах машинописного текста, содержит 30 таблиц, 35 рисунков, 6 схем. Список литературы включает 148 работ, из которых 127 – на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ПРОИЗВОДНЫЕ БЕТУЛИНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Основные виды биологической активности производных бетулина и бетулиновой кислоты

Биологическая активность производных бетулина подтверждается многочисленными литературными данными. Информация о результатах действия этих соединений, методики их исследования, а также и механизм их действия в основном носят описательный характер.

1.1.1. Противоопухолевая активность бетулина, бетулиновой кислоты и их производных

На сегодняшний день наиболее изученной является противоопухолевая активность бетулина (Б), бетулиновой кислоты (БК) и их производных (БП). В 1995 году впервые было обнаружено, что БК проявляет высокую цитотоксичность по отношению к меланоме человека путем индукции апоптоза опухолевых клеток. Замечательным является факт высокой селективности БК, выражающийся в том, что при высокой цитотоксичности к злокачественным клеткам БК не затрагивает нормальные клетки. Позже многочисленные исследования продемонстрировали, что нормальные клетки, такие как фибробласты кожи человека, лимфоциты периферической крови и меланоциты более устойчивы к БК, чем раковые клетки.

В дальнейшем появились сообщения о противоопухолевой активности БК, Б и БП в отношении широкого круга онкологических заболеваний (остеосаркома, саркома Юинга, фибросаркома, эмбриональная нейробластома, глиома, лейкемия, карциномы легких, толстой кишки, молочной железы, простаты, мочевого пузыря, желудка, поджелудочной железы, яичников, шейки матки и т.д.) [1 - 12]. Высокий

уровень цитотоксичности доказан в экспериментах *in vitro*, *in vivo* на моделях солидных опухолей, а также *ex vivo* на клеточных линиях (таблица 1.1). Бетулиновая кислота (БК) и ее производные (БП) обнаружили хорошую эффективность в опытах с трансплантированной опухолью поджелудочной железы, а также на моделях опухолей легкого и толстой кишки. В последнем случае вес опухоли значительно снижался, а продолжительность жизни животных увеличивалась [13].

Сложные эфиры БК в отношении меланомы В16 и опухоли печени Н22, проявляли клинические эффекты, схожие с препаратами циклофосфамид и 5-фторурацил [13].

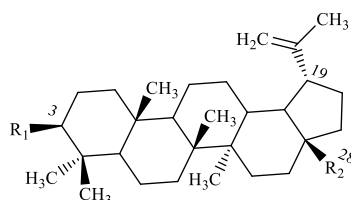
На клеточном уровне БК подавляет множественные деубиквитиназы, увеличивает количество полиубиквитинированных белков и снижает уровень онкопротеинов, вызывая тем самым апоптоз в клетках рака предстательной железы, но не в нормальных клетках простаты.

Бетулиновая кислота и ее синтетические БП дестабилизируют митохондрии (не затрагивая нормальные клетки), независимо от их p53 статуса [13,14, 26]. Индукцию апоптоза под действием Б, БК и БП, как правило, связывают со следующим:

- 1) с прямой регуляцией митохондриального апоптотического пути и нарушениями потенциала митохондриальной мембраны [21, 22];
- 2) высвобождением цитохрома с из митохондрий в цитозоль [11, 27-28];
- 3) увеличением активированных форм полирибозной полимеразы, фрагментацией ДНК [2, 20];
- 4) активацией инициаторных и эффекторных каспаз (3, 8 и 9) [14, 18, 29].

Влияние бетулина на пролиферацию и апоптоз клеток нейробластомы SK-N-SH, экспрессию или транслокацию связанных с апоптозом биомаркеров, включающих семейство протеинкиназ С (PKC), аналогично действию БК. В результате бетулин значительно ингибировал рост клеток SK-N-SH с полумаксимальной концентрацией ингибирования (IC_{50}) 8 мкмоль / мл.

Противоопухолевая активность бетулиновой кислоты (БК) и ее производных



Активность	Соединение	Эксперимент	Ссылки
Противо-опухолевая активность	Бетулиновая кислота R ₁ -OH R ₂ -CH ₂ COOH	Оценка IC ₅₀ Активность в отношении нейробластомы, глиобластомы, лейкемии <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> . IC ₅₀ <10 µg/ml	1
1.1. Меланома	Бетулиновая кислота	Оценка IC ₅₀ <i>ex vivo</i> на клеточных линиях меланомы Me-45, A-375, MelDuWi и MellJess/NoMelZh, <i>in vivo</i> на лошадях. IC ₅₀ = 2.6-13.3 µM	14
	Бетулин R ₁ -OH R ₂ -CH ₂ OH	Оценка IC ₅₀ на клеточных линиях нейробластомы <i>ex vivo</i> IC ₅₀ = 2.5 мкМ	7, 9, 15
1.1. Меланома	Фосфонаты бетулина R ₁ -OH, -OCOR; R ₂ -CH ₂ OH, -CH ₂ OCOR	Клеточные линии меланомы человека G361 и SK-MEL-28 <i>ex vivo</i> IC ₅₀ = 12.4 мкМ - 16.2 мкМ	9, 16
1.2. Рак груди	Бетулин	Оценка IC ₅₀ на клеточных линиях <i>ex vivo</i> MCF-7 и Vcap-37 IC ₅₀ = 20 мкМ	3, 9
	Фосфонаты бетулина	Клеточные линии рака груди человека T47D <i>ex vivo</i> : IC ₅₀ < 80 µg/ml	17
1.3. Опухоли мозга	Бетулин	Оценка IC ₅₀ на первичной культуре мультиформной глиобластомы человека HPGBM <i>ex vivo</i> IC ₅₀ = 2.8 - 3.4 мкМ	9
	Бетулиновая кислота	Оценка IC ₅₀ на клеточных линиях глиобластомы U87MG <i>ex vivo</i> IC ₅₀ ≈ 30 мкМ	18
	Фосфонаты бетулина	Клеточные линии глиобластомы человека SNB-19 <i>ex vivo</i> IC ₅₀ ≈ 23 мкМ	17, 19
1.1.3. Нейробластома	Бетулин	Оценка IC ₅₀ на клеточных линиях нейробластомы человека SK-N-SH <i>ex vivo</i> IC ₅₀ = 8 мкМ	9, 20
1.1.4. Рак простаты	Бетулин	Оценка антиинвазивной и антипролиферативной активности на клеточных линиях карциномы простаты человека PC-3, LNCaP, Ep156T <i>ex vivo</i> IC ₅₀ = 45 мкМ	9, 21

Таблица 1.1 (продолжение)

Активность	Соединение	Эксперимент	Ссылки
1.1.5. Рак яичников	Бетулиновая кислота	Были изучены увеличение скорости апоптоза клеток и морфологические изменения в митохондриальной мембране на клеточных линиях карциномы яичников OVCAR 432, RMS-13 и NIH-3T3 <i>ex vivo</i> IC ₅₀ = 5-10 мкМ	22
	Бетулин	Оценка IC ₅₀ на клеточных линиях A2780 и на первичной культуре НРОС карциномы яичников человека <i>ex vivo</i> IC ₅₀ = 2.26 мкМ - 11.29 мкМ	9, 23, 24
1.1.6. Рак шейки матки	Бетулиновая кислота	Исследование механизма индукции апоптоза на клеточных линиях карциномы шейки матки человека HeLa <i>ex vivo</i> IC ₅₀ = 66 μmol/l после 24 ч	25
	Бетулин	Оценка IC ₅₀ на клеточных линиях HeLa <i>ex vivo</i> IC ₅₀ = 75 мкМ после 24 ч	9

Кроме того, увеличивалась активность фермента РКС-δ, активирующего каспазы 3, 8 и 9, таким образом иницируя эндогенный апоптоз [20].

Некоторыми исследователями показано, что первичные опухолевые клетки (например, рака яичников) показали более высокую чувствительность к бетулину, чем к бетулиновой кислоте. Даже незначительные изменения в основной структуре бетулина могут быть достаточными для получения биологически и терапевтически важных производных.

Основные закономерности модификации структуры БК и противоопухолевой активности выражаются в следующем:

- прививка аминокислот или других гидрофильных фрагментов к бетулиновой кислоте усиливает ее растворимость в воде, снижает токсичность при сохранении цитостатической активности [30];
- гетероциклы, конденсированные с кольцом А (при С-3), а также введение азотистых заместителей, таких как пиразиновый, пиразольный, оксазольный, индольный и пиридиновый фрагменты, усиливают подавление инвазивности клеток РС-3; [16, 31];

- производные дигидробетулиновой кислоты эффективнее, чем нативные соединения [16];
- окисление кратной связи при C-20 снижает цитостатическую активность [16];
- метаболиты БК снижают цитостатическую активность в отношении клеток меланомы [31];
- окисление до бетулонового или бетулинового альдегида усиливает антилейкемическую активность [1].

Влияние модификации структуры БК по C-3, C-19 и C-23 положениям на цитотоксичность различных клеточных линий опухолей (указаны в скобках) приведено в таблицах 1.2-1.5 [1].

Таблица 1.2

Цитотоксичность БП, модифицированных по C-28

R =	Цитотоксичность (мкМ/л)
	IC ₅₀ = 20.47 (HCT-116)
	IC ₅₀ > 25 (HCT-116)
	IC ₅₀ = 10.7 (CEM)
	IC ₅₀ > 100 (SF-763)

Таблица 1.3

Цитотоксичность БП, модифицированных по C-19

R =	Цитотоксичность (мкМ/л)
	IC ₅₀ = 52.23 (MCF-7)
	IC ₅₀ = 44.40 (MCF-7)
	IC ₅₀ = 6.84 (MCF-7)
	IC ₅₀ > 25 (HCT-116)
	IC ₅₀ > 10 (Colo-38)
	IC ₅₀ = 5.0 (L132)

Таблица 1.4

Цитотоксичность БП, модифицированных по С-3

R =	Цитотоксичность (мкМ/л)
 Lys	IC ₅₀ = 9.7 (EPG85-257P)
	IC ₅₀ = 5.5 (MCF - 7)
	IC ₅₀ = 0.80 (MDA-MB-231)
	IC ₅₀ = 7 (Daoy)
 β-D-Glc	IC ₅₀ = 32 (DLD-1)
	IC ₅₀ = 9.62 (HCT-116)
	IC ₅₀ = 8.17 (MCF-7)
	IC ₅₀ = 10.42 (MCF-7)
	IC ₅₀ = 17.2 (PA-1)
	IC ₅₀ = 7.2 (PA-1)

Таблица 1.5

Цитотоксичность БП, модифицированных по С-23

R =	Цитотоксичность (мкМ/л)
 23-NBA	
 CHO	IC ₅₀ = 79.23 (B16)
 Ph	IC ₅₀ = 65.79 (B16)
R =	Цитотоксичность (мкМ/л)
 Gly	IC ₅₀ > 50 (EPG85-257P)
	IC ₅₀ = 4.0 (SW1736)
	IC ₅₀ = 3.5 (HCT-116)
	IC ₅₀ = 28.5 (HeLa)

Из данных таблиц 1.2-1.5 по цитотоксичности следует, что модификация БК незначительно улучшает цитотоксичность исходной БК, следовательно, наличие карбоксильной (кислотной) группы при С-28 очень важно. Наибольший отклик по цитотоксичности модифицированных БК получает дериватизация по С-3 положению.

В целом, анализ литературных данных показывает, что производные бетулиновой кислоты благодаря своей низкой токсичности и селективности

воздействия на опухолевые клетки, а также широкому спектру действия являются многообещающими кандидатами на ФАС. В настоящее время лидером в этом направлении остается исходная бетулиновая кислота, поскольку синтез ее производных является очень дорогостоящим и экологически небезопасным.

1.1.2. Противовирусная активность бетулиновой кислоты и ее производных

Потенциальным препаратам с анти-ВИЧ активностью БК и ее производных, а также анализу взаимосвязи «структура-активность» посвящен ряд работ, наиболее полной из которых является обзор Абышева А.З. [15].

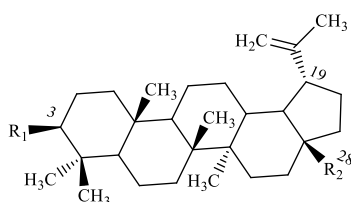
На анти-ВИЧ-активность влияют функциональные группы при атомах углерода С-3 и С-28 (заместители спиртового гидроксила):

1. Нецелесообразны 3 α -гидрокси-, 3-кето-, 3-алкиламидо-3-дезоксид-, 3-амино-, 2,3-ен-, 2,3-дикето- и 2-гидрокси- заместители. При этом С-3 сложноэфирные боковые цепи, содержащие 4–5 карбонных атомов с 3'-метил-группой, значительно повышают активность.

2. Изопропенильный фрагмент также оптимален для проявления анти-ВИЧ активности, а дигидрирование по изопропенильному фрагменту или любое другое взаимодействие по С-30 приводит к повышению токсичности [15]. Авторы обзора также делают вывод, что все высокоактивные соединения этого ряда имеют в своей структуре как минимум одну свободную терминальную карбоксильную группу.

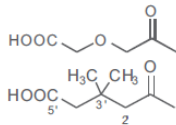
В таблице 1.6 систематизированы литературные данные о соединениях этого ряда с противовирусной активностью. На сегодняшний день оптимальным анти-ВИЧ производным БК считается **бевиримат**, действующий как на ВИЧ-1, так и на ВИЧ-2, аналогично зидовудину.

Противовирусная активность бетулиновой кислоты (БК) и ее производных
[2, 32-33]



Активность	Соединение	Эксперимент	Ссылки
2.1. Анти-ВИЧ активность	<p>Бетулиновая кислота R₁ -ОН R₂ -CH₂COОН</p> <p>Дигидробетулиновая кислота</p> <p>Никотинат бетулиновой кислоты</p>	<p>Подавление репродукции Н9-лифоцитов <i>ex vivo</i>: EC₅₀ = 1,4 мкМ – БК. EC₅₀ = 0,9 мкМ Б – ниже активность, нужна карбонильная группа.</p>	34-36
	<p>Диметилсукцинил-производные, амиды и пептиды бетулиновой и бетулоновой кислот. R₁ -ОН, =О; R₂ -CH₂COОН</p>		
2.1. Анти-ВИЧ активность	<p>N'-{N-[36-гидроксил-20(29)ен-28-оил]-8-амино октаноил}-1-статин</p> <p>R₁ -ОН</p>	<p>Производные бетулиновой кислоты <i>ex vivo</i> блокируют слияние клеток и инфицирование ВИЧ-1 на стадии после связывания, препятствуя достижению gp41 его активной конформации</p>	34, 35, 37
	<p>Диметилсукцилаты бетулиновой кислоты</p> <p>R₁ -O-CO-C(CH₃)₂-COOH</p> <p>R₂ -CH₂COОН</p>		
	<p>Бевиримат</p> <p>R₁ -O-CO-C(CH₃)₂-COOH</p> <p>R₂ -CH₂COОН</p>	<p>Проходит клинические испытания на пороге третьей фазы компанией Myriad Pharmaceuticals в США</p>	38

Таблица 1.6 (Продолжение)

Активность	Соединение	Эксперимент	Ссылки
2.1. Анти-ВИЧ активность	3- <i>O</i> -ацильные производные БК R ₁  и др. R ₂ -ОН, -CH ₂ COОН	Оценка EC ₅₀ (мкМ) и IC ₅₀ (мкМ) против ВИЧ-1 штаммов ПИВ/LAI <i>in vitro</i>	1, 13, 37
2.2. Активность против вируса простого герпеса 1 типа	Бетулин и бетулиновая кислота, модифицированные по С-3 и С-28 R ₁ -ОН, -OCOR; R ₂ -CH ₂ ОН, -CH ₂ OCOR Амиды, уреиды, замещенные бензальгидразины бетулина и бетулиновой кислоты R ₁ -ОН, -OCOR; R ₂ -CH ₂ ОН, -CH ₂ OCOR	Оценка EC ₅₀ относительно вируса простого герпеса 1 типа HSV-2 <i>in vitro</i> .	35, 39
2.3. Активность против вируса Эпштейна-Барр (вирус герпеса 4)	Бетулиновая кислота	Показано, что исследуемое соединение подавляет репликацию вируса EBV посредством супрессии SOD с последующей генерацией активных форм кислорода (ROS) и повреждением ДНК в EBV-трансформированной лимфобластоидной клеточной линии <i>in vitro</i>	32

Таким образом, все производные бетулина и бетулиновой кислоты проявляют противовирусное действие, в том числе, анти-ВИЧ активность. Однако, также как и в случае с противоопухолевой активностью, синтез всех высокоэффективных БП является крайне дорогостоящим, протекающим с низким выходом и экологически небезопасным. Именно этим объясняется тот факт, что для наиболее перспективного анти-ВИЧ соединения – Бевиримата, прошедшего III фазы клинических испытаний, в настоящее время дальнейшие клинические испытания приостановлены.

1.1.3. Другие виды активности бетулиновой кислоты и ее производных

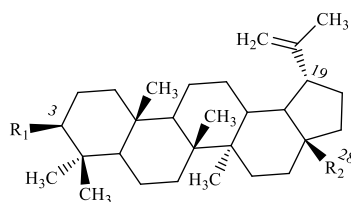
Наиболее изученными для бетулина (Б), бетулиновой кислоты (БК) и их производных (БП) являются антибактериальное, противовоспалительное (противоаллергическое), противомаларийное, антигельминтное и гепатопротекторное действие (таблица 1.7, [5, 21, 28, 33, 37, 40-42, 44]).

В настоящее время многие предлагаемые механизмы воздействия Б, БК и БП при лечении различных заболеваний переосмысляются [9, 23, 45]. Например, противоречивыми являются данные по механизму и подтверждению антибактериального действия Б и БК [46]. Антибактериальное действие в отношении *E.coli*, *P.aeruginosa*, *St.aureus* Б, БК и БП обусловлено усилением оксидативного стресса за счет увеличения продукции супероксид-анионных радикалов и увеличения отношения $NAD^+/NADH$ в бактериальных клетках, что, в конечном счете, приводит к гибели бактерий [46]. Прооксидантный эффект подтверждался повышением уровня малонового диальдегида в бактериальных клетках, при этом соотношение восстановленного и окисленного глутатиона характеризует усиление антиоксидантной активности редокс-ферментов. Бетулин и БП проявляют противовоспалительное и противоязвенное действие благодаря ингибирующим эффектам по отношению к монооксиду азота [23].

Принципиально новым выявленным свойством БК и бетулина является способность этих соединений ингибировать остеокластогенез [47]. Это свойство чрезвычайно важно для медицинской практики, поскольку открывает новый путь для получения новых препаратов для лечения заболеваний костной ткани и может быть компонентом биомиметической кости.

Недавними исследованиями было показано антикоагуляционное и антиагрегационное действие бетулиновой кислоты и 3-ацетата бетулина [54-56].

Прочие виды активности бетулиновой кислоты (БК) и ее производных



Активность	Соединение	Эксперимент	Ссылки
3.1. Антибактериальная	Бетулиновая кислота R ₁ -ОН R ₂ -CH ₂ COOH 28-О-(N-цетилантраилоил) бетулин	Влияет на штаммы <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> и грибковый штамм <i>Candida albicans</i> . Активен против двух грамположительных бактерий, <i>E. faecalis</i> и <i>S. aureus</i> .	21, 23, 33, 42, 49
3.2. Противовоспалительная (Противоаллергическая)	Бетулиновая кислота	Показано, что производные бетулина избирательно ингибируют экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) посттранскрипционным способом, а также ингибируют образование оксида азота (NO), подавляют экспрессию цитокинов интерлейкина-6 (IL-6) и хемотаксического белка-1 моноцитов (MCP-1), а также экспрессию простагландин-синтазы-2 (ЦОГ-2).	23, 41, 49-52
3.3. Анальгетическая	Бетулиновая кислота	Выраженные антиноцицептивные свойства на модели «корчи» (writing test) и при инъекциях формалина у мышей <i>in vivo</i>	41, 49
3.4. Противомаларийная	Бетулиновая кислота, Бетулин (менее эффективен) R ₁ -ОН R ₂ -CH ₂ OH, -CH ₂ COOH	Антиплазмодная активность <i>ex vivo</i> (IC ₅₀) против резистентного к хлорохину (K1) и чувствительного (T9-96) <i>Plasmodium falciparum</i> , против штаммов K1 и T9-96. Бетулиновая кислота <i>in vivo</i> в модели малярии на мышях (<i>P. berghei</i>), верхняя доза неэффективна и токсична при паразитемии.	21, 23, 53

Таблица 1.7 (Продолжение)

Активность	Соединение	Эксперимент	Ссылки
3.5. Антигель- минтная	Метанольные, гексановые и этилацетатные экстракты <i>Berlina grandiflora</i> , содержащие бетулиновую кислоту (основной компонент)	Оценивали активность по количеству подвижных червей свободной живой нематоды <i>in vitro</i> . Сырые экстракты (500 ppm) показали антигельминтную активность в порядке этилацетат > метанол > гексан. Бетулиновая кислота из этилацетатной фракции имеет сильную антигельминтную активность при 100 ppm, сравнимую с пиперазином.	21, 40
3.6. Гепатопротекторная активность	Бетулин R ₁ -OH R ₂ -CH ₂ OH	Подавление цитотоксического действия CdCl ₂ в концентрации менее 0.1 мкг/мл (2.10 ⁻⁷ M) на культуре раковых клеток печени человека <i>ex vivo</i>	24, 28, 43
3.7. Ингибитор фосфолипазы	Производные бетулина и бетулиновой кислоты R ₁ -OSO ₂ (OH) и их соли, -OP(O)(OH) ₂ и их соли, -OCH ₂ COOH и их соли; R ₂ -CH ₂ OSO ₂ (OH) и их соли, -CH ₂ OP(O)(OH) ₂ и их соли, -CH ₂ OCH ₂ COOH и их соли	Определение антигемолитической активности в гемолитической системе <i>in vitro</i> (бараньи эритроциты, комплемент морской свинки): сенсibilизированные кроличьими антителами бараньи эритроциты, образец исследуемого вещества, комплемент морской свинки.	54
3.8. Ингибитор остеокласто- генеза	Бетулин Бетулиновая кислота	Ингибирование остеокластогенеза <i>ex vivo</i> (блокировка экспрессии NFATc1) на клеточной линии макрофагов костного мозга мышей.	48
3.9 Антикоагу- лянтная, антитромбо- тическая активность	Бетулиновая кислота R ₁ -OH R ₂ -CH ₂ COOH	Исследования <i>in vitro</i> на активность агрегации тромбоцитов в отношении тромбина, аденозиндифосфата (ADP) и индуцированной адреналином агрегации тромбоцитов у крыс. Тритерпены проявляли дозозависимую ингибирующую активность в отношении агрегации тромбоцитов.	55-57
3.10 Ранозажив- ляющая активность	Бетулин	Олеогель-S10 - гель для местного применения, изготовленный из масла подсолнечника с 10% содержанием тритерпенового экстракта из бересты. Исследовался на острых и хронических ранах.	58

Таблица 1.7 (Продолжение)

Активность	Соединение	Эксперимент	Ссылки
3.11 Антидиабетическая и антигипертензивная активность	Бетулиновая кислота R ₁ -ОН R ₂ -CH ₂ COOH Бетулин	Бетулиновая кислота продемонстрировала защитные эффекты на сердечно-сосудистую систему как на моделях <i>in vivo</i> , так и <i>in vitro</i> . У крыс с гипертонической болезнью, внутрибрюшинное введение бетулиновой кислоты (20 мг / кг) в течение 2 недель приводило к заметному повышению уровня АФК и снижению уровня NO и SOD, а также снижению активности eNOS в аорте.	28

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что производные бетулиновой кислоты являются перспективными лекарственными веществами, спектр фармакологической активности которых зависит от заместителей, главным образом при С-3- и С-28-углеродных атомах лупанового скелета. Наиболее изученным видом биологической активности является противоопухолевое действие, при этом основным стандартом лекарственного вещества среди соединений лупанового ряда остается бетулиновая кислота. Поиск новых производных бетулиновой кислоты, сохраняющих ее главное свойство – высокую цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам и низкую токсичность для организма, является актуальной задачей фармацевтической химии.

1.2. Структура и физико-химические свойства производных бетулина и бетулиновой кислоты

Свойства бетулина, бетулиновой кислоты и их производных определяются особенностями строения этого класса соединений и их склонностью к образованию димеров, полиморфизму и изомеризации.

Бетулин (бетулинол, луп-20(29)-ен-3 β ,28-диол) $C_{30}H_{50}O_2$ – это тритерпеновый спирт лупанового ряда, в котором циклогексановые кольца находятся в конформации «кресло», а циклопентановое кольцо – «полукресло» (рисунок 1.1). Константы спин-спинового взаимодействия, наблюдаемые в 1H ЯМР спектрах, подтверждают конформацию «кресла» шестичленных колец бетулина. Кроме этого, геометрию молекулы бетулина будет также определять расположение атомов водорода и функциональных групп, присоединенных к основному ядру: α - или β - ориентация в пространстве, α - и β -эпимеры по положению С-3 [Л.Б. Шон, 1998]. Близкую структуру имеет бетулиновая кислота. Гидроксильная группа при С-3 в экваториальном положении (β -ОН) придаёт молекуле бетулина большую термодинамическую устойчивость, чем в аксиальном положении (α -ОН), поскольку в α -положении существует напряжение за счет отталкивания соседних атомов.

В силу этих причин бетулин обладает конформационной лабильностью (термодинамической неустойчивостью), зависящей от химических и физических свойств среды, при этом происходит изменение структуры не только участка, контактирующего с другой молекулой, но и конформации бетулина в целом. Кроме того, конформационная лабильность определяет конформацию «кресло» циклогексановых циклов, которые смещаются относительно друг друга. Трансаннулярные взаимодействия между несвязанными атомами водорода снижают стабильность молекулы, в особенности при близости атомов друг к другу.

Конформационная лабильность также возникает из-за подвижной структуры сочленения циклов, наличия 4 ангулярных метильных групп и 2 гемдиметильных

групп, терминальной метиленовой группы. Кроме того, эти тритерпеноиды чувствительны к воздействию различных факторов, вызывающих миграцию метильных групп и протонов между циклами.

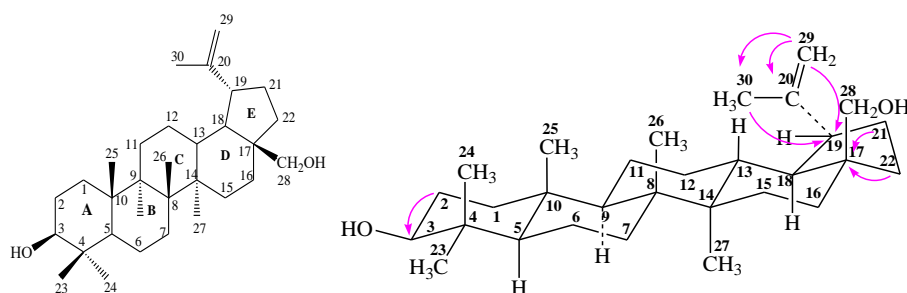


Рисунок 1.1 – Структурная формула бетулина

Эти особенности структуры бетулина, бетулиновой кислоты и ее производных обуславливают не только высокую лабильность, но и теоретически возможное существование оптических изомеров и эпимеров, а также способность к изомеризации.

Высокую склонность бетулина к изомеризации, например, по изопропенильному фрагменту, можно проиллюстрировать легкостью превращения бетулина в его структурный стереоизомер – аллобетулин, под воздействием таких кислот, как муравьиная, серная с уксусной, ортофосфорная, хлористоводородная в этаноле, диметилсульфата, *p*-толуолсульфокислоты в сухом хлороформе, трифторуксусной кислоты [58], а также под действием кислот Льюиса – $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ в хлороформе и т.д. (рисунок 1.2).

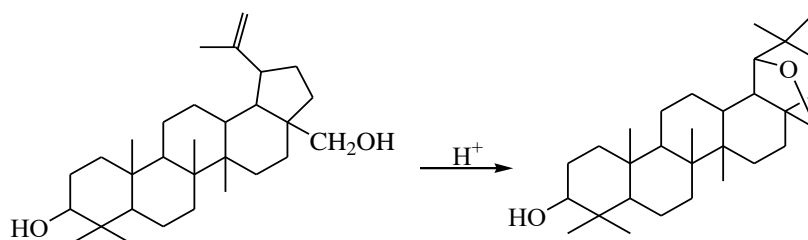


Рисунок 1.2 – Изомеризация бетулина в аллобетулин.

Следует отметить удивительное сходство структуры бетулина, бетулиновой кислоты (БК) и их производных с холестанолом (рисунок 1.3), что делает их перспективными препаратами для лечения заболеваний печени.



Рисунок 1.3 – Конформационная структура бетулина (а) и холестеранола (б)

Межмолекулярные взаимодействия двух термодинамически неустойчивых молекул бетулина обуславливают различные перегруппировки, миграции метильных или гидроксильных групп, а также определяют важнейшие физико-химические свойства бетулина и его производных, в том числе растворимость.

Основными межмолекулярными взаимодействиями, определяющими растворимость, являются следующие: слабое Ван-дер-Ваальсовское притяжение (индуцированные диполи), между неполярными группами (0,5 – 1) ккал/моль; диполь-дипольное связывание (1 – 10) ккал/моль, в котором формирование водородных связей является частным примером и вносит вклад в гидрофильность; ионное связывание (5 ккал/моль), которое практически отсутствует в молекулах тритерпеноидов.

Межмолекулярные взаимодействия, как гидрофобное связывание, так и образование Н-комплексов с органическими растворителями, в молекулах тритерпеноидов в твердой фазе приводят к различным полиморфным и сольватополиморфным формам. Так, сольват бетулина с этанолом состава 1:1 имеет ромбическую сингонию в пространственной группе $P212121$, $Z=4$, молекулы бетулина соединены друг с другом и с молекулами этанола водородными связями, в результате чего в структуре выделяются слои, перпендикулярные кристаллографическому направлению c . Внутри слоя все молекулы соединены водородными связями, между слоями существуют только Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия [Т.Н. Дребущак, 2010].

Наиболее устойчивая полиморфная форма, как энергетически наиболее выгодная при определенных условиях кристаллизации и более упорядоченная, обычно обладает худшей растворимостью. Метастабильные сольватополиморфы,

хотя и обладают лучшей растворимостью, могут быть токсичными из-за присутствия в них молекул растворителя.

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 1.4).

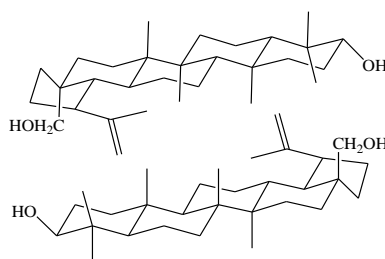


Рисунок 1.4 – Димерная структура бетулина

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

В работах [59-65] были проведены исследования рентгенограмм сольватов бетулина и бетулиновой кислоты 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 бетулина, перекристаллизованные из ацетона, метанола, этанола и пропанола, являются нестабильными и теряют растворитель при хранении даже при комнатной температуре. В целом, кристаллизация бетулина и его производных наиболее благоприятна из спиртовых растворителей, обладающие большей полярностью, потому что они не изменяют их структуру. Пять сольватов бетулиновой кислоты – с диметилсульфоксидом, метанолом, этанолом,

изопропиловым спиртом и 2-бутанолом, имеют близкую структуру, доказанную рентгеноструктурным анализом. Также, как и в сольватах с бетулином, кристаллическая структура сольвата стабилизируется за счет водородных связей [59]. Сольваты бетулина и бетулиновой кислоты с этанолом и ДМСО являются привлекательными для фармацевтической промышленности (рисунок 1.5).

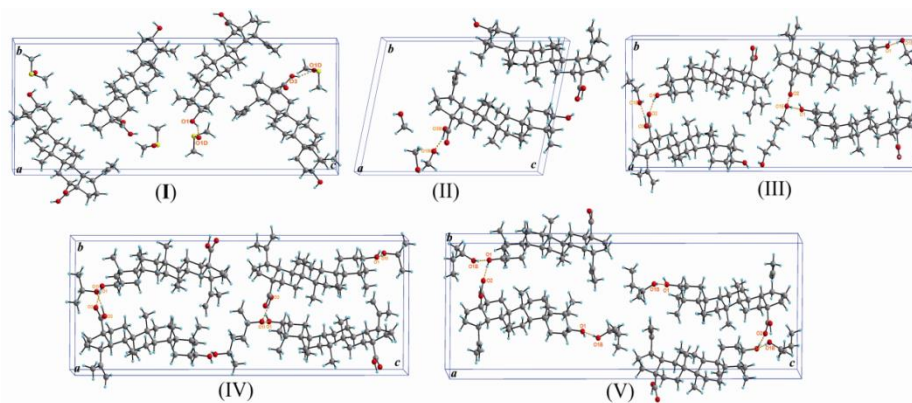


Рисунок 1.5 – Молекулярная упаковка кристаллической ячейки сольватов бетулиновой кислоты вдоль кристаллографической оси *a*. Атомы кислорода обозначены красным цветом, углеродные атомы – серым, водородные атомы – голубым. Основные водородные связи обозначены желтым пунктиром. Сольваты (I) DMSO, (II) метанол, (III) этанол; (IV) изопропанол, (V) 2-бутанол [59].

В целом, существование нестабильных сольватов и сольватополиморфов или других полиморфных форм является большой проблемой в фармацевтической промышленности, поскольку обычно такие образцы полиморфов способны изменяться во времени, иногда полностью исчезая и превращаясь в другую полиморфную форму с меньшей растворимостью. Так, например, для близкой циклопентанпергидрофенантеновой структуры – прогестерона, известного более чем 70 лет и имеющего более пяти полиморфов, крайне трудно провести стандартизацию препаратов. Первично известный очень эффективный прогестероидный полиморф «исчез», поскольку он стабилизировался примесями. Современная технология очистки прогестерона не позволяет получить нужный полиморф, и требуются исключительные условия при кристаллизации для стабилизации необходимого полиморфа [66].

Явление «исчезающих» полиморфов, где устойчивая форма уже не может быть регулярно воспроизведена, является научной «анафемой». В принципе, должно быть возможно воспроизвести любой метастабильный полиморф, повторив соответствующие условия кристаллизации, однако исторический профиль примесей, стабилизирующий метастабильную форму, в настоящее время недопустим. Другие «исчезающие» полиморфы могут быть определены на основе тщательного изучения термодинамики и фазовой диаграммы для выявления узкой области условий кристаллизации, в которой нужный полиморф является термодинамически стабильным продуктом. Однако метастабильные полиморфы, имеющие кинетические барьеры для зарождения или превращения в монотропно связанную термодинамическую форму, будут труднее воспроизводимо кристаллизоваться, поскольку примеси, влияющие на этот процесс, изменяются со временем.

Сведения о растворимости бетулина и его производных в различных средах разрозненны и противоречивы [D. Cao, 2007; G. Zhao, 2007]. Более глубокие исследования о взаимодействии бетулина с растворителями появились только в последнее время. Растворители по способности растворять бетулин, можно расположить в ряд: 1-бутанол > 1-пропанол > этанол > 1-пентанол > 1-гексанол > метанол и этилацетат > метилацетат > этилформиат > метилформиат; его растворимость в чистых органических растворителях увеличивается с ростом температуры.

Растворимость бетулина в смеси ацетон–вода и этанол–вода увеличивается при повышении температуры и преобладании в составе ацетона или этанола. К сожалению, количественные характеристики растворимости бетулиновой кислоты и ее производных в литературе практически отсутствуют и не обсуждаются. В работе [43] указана растворимость бетулиновой кислоты $3 \cdot 10^{-3}$ г/л, однако, не указано, для какой полиморфной формы она определена. Для большинства близких тритерпеноидов растворимость лежит в интервале $2,5 \pm 0,5$ г/л. В работе этих же авторов для бетулина и лупеола указана величина липофильности $\text{Log } P_{ow}$, где P_{ow} – коэффициент распределения между октанолом и водой, рассчитанная в

программе ChemAxon, но не установленная экспериментально [43]. Величина липофильности $\text{Log } P_{ow}$ очень большая и равна 6,17 и 7,45 для бетулина и лупеола, соответственно. Липофильность тритерпеноидов, охарактеризованная P_{ow} , в предположение, что октанол имеет липофильность, аналогичную клеточным мембранам, используется в качестве одного из показателей абсорбции лекарств при пассивной диффузии. Соединения с низкой растворимостью в воде и высоким $\text{Log } P_{ow}$ будут медленнее распределяться от клеточной мембраны к внеклеточной жидкости (трансклеточный путь) [67].

Таким образом, для бетулина и бетулиновой кислоты, а также их производных возникают сложности стабилизации структуры, проблемы при растворении и, соответственно, биодоступности, а также создания инъекционных лекарственных форм. Эти соединения являются исключением из «правила пяти» [68] и способны к взаимодействию как за счет водородных связей, так и гидрофобного связывания, что приводит к образованию димеров, плотной кристаллической упаковке и полиморфизму.

1.3. Приемы увеличения растворимости производных бетулина и бетулиновой кислоты

Биодоступность труднорастворимых лекарственных препаратов может быть улучшена за счет различных коллоидно-химических подходов и модификацией бетулина и бетулиновой кислоты прививкой гидрофильных групп путем химического синтеза. Химическая модификация позволяет также увеличить растворимость индивидуальных соединений.

1.3.1. Коллоидно-химические подходы улучшения биодоступности тритерпеноидов

Используют пять основных приемов улучшения биодоступности, представленных ниже.

1.) **Встраивание этих соединений в липосомы, везикулы и другие наночастицы** [69, 70]. Наиболее изучены везикулы или липосомы из водных дисперсий, содержащих лецитин (например, фосфатидилхолин) и тритерпеноид, растворенный в ДМСО или спирте [А.Б. Каплун, 1999]. Поверхностно активные вещества, в том числе полимерной природы (поливинилпирролидон, проксанол и др.) увеличивают агрегационную стабильность липосом. Наночастицы с бетулиновой кислотой также получают из полимеров, при этом наиболее перспективным является легкодеградируемый сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) [70].

2.) **Получение мицелл на основе высокомолекулярных соединений** [71]. Примером полимеров, рекомендуемых к использованию в фармации, являются сополимеры водорастворимого, неиммуногенного и биосовместимого N-(2-гидроксипропил)метакриламида (пГПМА). На основе этого сополимера можно

получать мицеллярные системы с бетулиновой и бетулоновой кислотами, в которых полимер будет выполнять роль вектора доставки [71, 72].

3.) **Коллоидно-химическое растворение за счет физического воздействия** (ультразвуковое воздействие, механохимия и т.д., таблица 1.8). В работах С.А. Кузнецовой, Т.П. Шахтшнейдер, Ю.Н. Маляра и др. Красноярского Института химии и химической технологии СО АН предложена механическая активация бетулина и эфиров бетулиновой кислоты в присутствии полимеров (поливинилпирролидона, полиэтиленгликоля, арабиногалактана и др.) [73]. В результате такого воздействия биологически активные (гастропротекторные и противоопухолевые) свойства тритерпеноидов возрастают по сравнению с чистыми веществами.

Таблица 1.8

**Коллоидно-химические подходы улучшения биодоступности
бетулина и его производных**

Метод	Структура	Условия получения	Результат	Ссылки
1. Механохимический	Композиты: бетулин/диацетат бетулина с ПЭГ/ПВП	Механическую активацию смесей проводили в планетарно-центрической мельнице в присутствии 5-10% этанола.	Гомогенизация Б и ДАБ с полимерами. $C_{(Б+ПВП)} = (52.4 \pm 2.0) \cdot 10^{-3} \text{ г/л}$	80
2. Образование комплексов и конъюгатов				
2.1. Получение комплексов производных бетулина с полисахаридами и др. полимерами	Комплексы диацетата бетулина с арабиногалактаном	Смесь арабиногалактана и диацетата бетулина в воде перемешивают при 37°C в течение 48 часов. Из фильтрата при пониженном давлении при 35-40°C получают тонкую гибкую пленку.	Комплекс арабиногалактана и диацетата бетулина коллоидно-растворим в воде	82
2.2. Получение устойчивых коллоидных дисперсий	Комплексы диацетата бетулина с аэросилом	Механическую активацию смесей ДАБ с аэросилом проводят в ударно-шаровой мельнице от 5 до 30 мин. Соотношение компонентов «диацетат бетулина – аэросил» составляет 1:9 (по массе).	Растворимость комплекса: 6,1 мг/л, что примерно в 8 раз выше, чем у исходных веществ	74

4.) **Образование комплексов включения** [74]. Приемом увеличения растворимости тритерпеноидов может быть комплексообразование с γ -циклодекстрином, глицирризиновой кислотой и другими соединениями, способными образовывать комплексы включения за счет гидрофобного связывания

[75]. В работе Falamas проведены детальные спектроскопические исследования комплексов «хозяин-гость» образованных бетулином и гидроксипропил- γ -циклодекстрином состава 1:1 и 1:2 (рисунок 1.6).

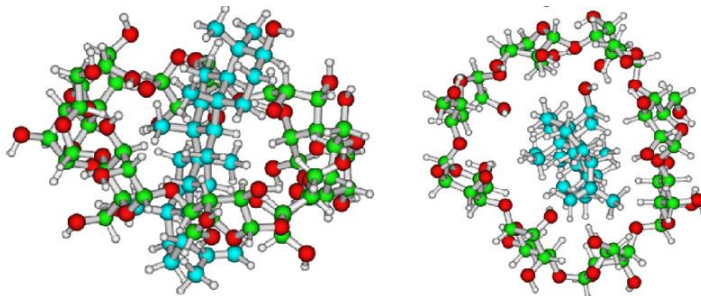


Рисунок 1.6 – Комплекс включения бетулина и γ -циклодекстрина состава 1:1 и 1:2

Анализ комплексов включения показал, во-первых, что молекула «гостя» находится в полости между внешними липофильными сторонами двух молекул бетулина. Во-вторых, молекулы бетулина связаны между собой водородными связями, так что в кристаллической структуре комплекса видны димеры, в которых молекулы бетулина связаны водородными связями по типу «голова к хвосту». Индивидуальный бетулин в кристалле, вероятно, существует в виде водородно-связанных димеров по типу «голова к голове», что на основании данных колебательных спектров и данных рентгеноструктурного анализа, характерно для всех карбоновых кислот [75].

Комплексы включения с циклодекстринами в воде диссоциируют на циклодекстрин и лекарственное вещество, проявляя биологические свойства последнего [75-78].

Другими авторами предприняты попытки получить комплексы включения бетулина с лекарственными веществами типа пиразолов в растворе. Авторы работы [74] показали образование комплексов по типу «хозяин – гость» бетулина и его производных (аллобетулин, бетулиновая кислота, 3-кетобетулиновая кислота) с пиразолами. Ранее нами [Н.Б. Мельникова, 2008] были получены комплексы биацетата бетулина с метамизол-натрием (1-фенил-2,3-димер-4-метиламино-пиразолон-5-*N*-метансульфонатом натрия) состава 1:1. Можно предположить, что

при оптимальном выборе ингредиентов, возможно синтезировать комплексы «хозяин-гость» с бетулином, обладающие необходимым гидрофильно-липофильным соотношением.

5.) Использование полимеров с привитыми тритерпеноидами как водорастворимых полимерных конструкций. В соответствии с этим подходом на первой стадии обычно получают терпенсодержащий мономер, который затем вводится в радикальную сополимеризацию. Например, при взаимодействии бетулина с малеиновой кислотой в присутствии дициклогексилпероксидикарбоната при комнатной температуре образующийся мономер 28-О-малеат бетулина вступает в реакцию сополимеризации с N-винилпирролидоном, акрилонитрилом, винилацетатом в присутствии радикальных инициаторов. Полученные полимеры проявляют более высокую активность в отношении культуры рабдомиосаркомы RD TE32 по сравнению с малеатом бетулина [82].

Таким образом, можно отметить, что повышение биодоступности бетулина и его производных с использованием коллоидно-химических подходов, выражающихся в получении различных наночастиц, как везикулярных, так и мицеллярных, является очень плодотворным, но не решает проблему растворимости тритерпеноидов лупанового ряда.

1.3.2. Повышение растворимости путем химической модификации бетулина, бетулиновой кислоты и их производных

Улучшение не только биодоступности, но и растворимости тритерпеноидов, как и любых гидрофобных ЛВ, может быть достигнута химическим синтезом, приводящим к прививке функциональных групп, таких как карбоксильная, гидроксильная, аминогруппа, фосфатная/фосфонатная и карбонильная. Химическая модификация исходных соединений – ЛВ, включает в себя

образование эфиров, карбонатов, карбаматов, амидов, фосфатов, оксимов и других производных, которые часто рассматривают как пролекарства (схема 1.1).

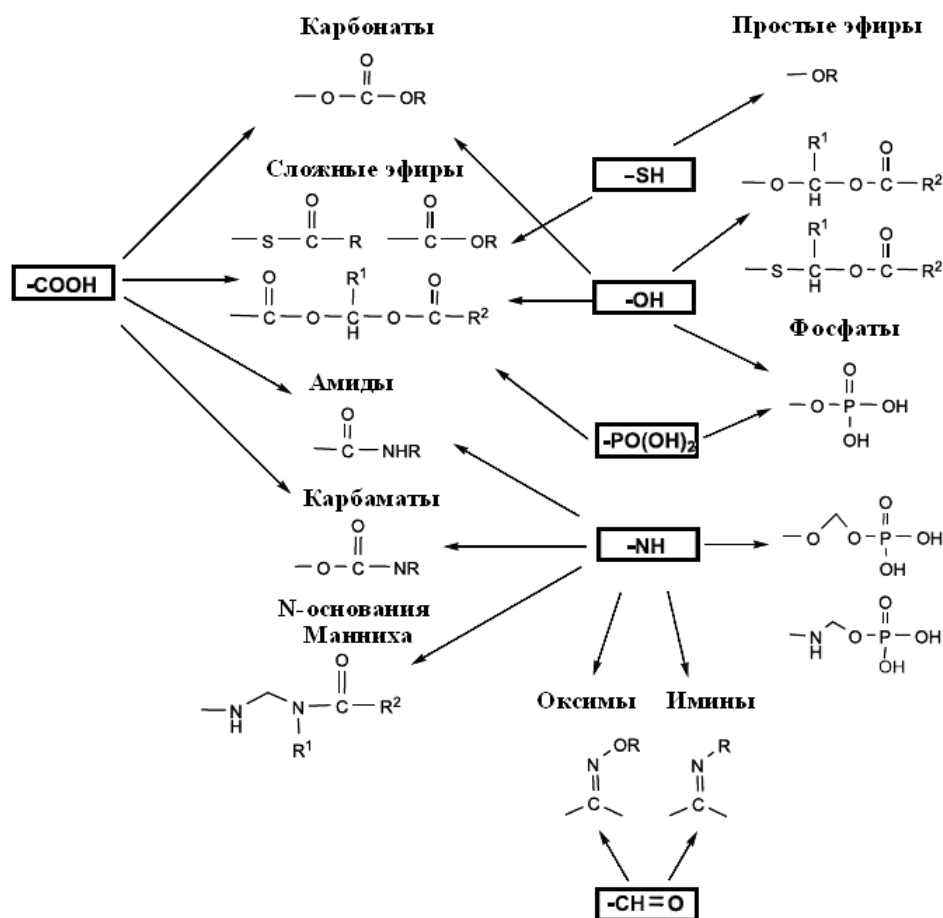


Схема 1.1 – Варианты модификации структуры лекарственных веществ [83]

Синтезу производных бетулина, обладающих, биологической активностью, посвящено множество исследований, в том числе в обзорах [11, 15, 16, 84]. Российская научная школа является лидером в синтезе биологически активных производных бетулина и бетулиновой кислоты [Г.А. Толстикова, 2005]. В работах ведущих исследователей Г.А. Толстикова, О.Б. Флехтер (Казаковой), М.А. Михайленко, Т.П. Шахшнейдер, А.Н. Каплуна, С.А. Кузнецовой и др. (1990-2018 гг.) описаны синтезы новых функционализированных терпеноидов, однако детально растворимость в этих работах не изучена. Работы по целенаправленному синтезу производных бетулина и бетулиновой кислоты с улучшенной растворимостью начались в 2000-2012 годах, впервые сделан акцент на синтезе производных бетулина с улучшенной растворимостью в обзоре патентов Гзука

[39]. Следует отметить следующие основные направления по синтезу гидрофильных производных бетулина:

1. Получение эфиров бетулина по положению С-3 и С-28 и бетулиновой кислоты по положению С-3 с L-аминокислотами [84]. Синтез проводился с использованием связующих агентов (наиболее часто используемые – N,N-дициклогексилкарбодиимид и 4-диметиламинопиридин) и L-Вос защищенными аминокислотами (глицин, аланин, метионин, лизин и др.).

Растворимость оценивали методом ВЭЖХ после введения тритерпеноида в ДМСО (1 мг в 100 мкл) в дистиллированную воду.

2. Синтез фосфолипидов бетулина (например, 28-O-(1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфо)-бетулина) и их солей [86]. Синтезы были проведены с применением различных связующих веществ (2-мезитилсульфонил хлорид, п-толуолсульфонилхлорид и N,N'-дициклогексилкарбодиимид) и в присутствии 4-диметиламинопиридина в пиридине.

3. Синтез эфиров бетулиновой кислоты с конъюгатами линолевой кислотой [87].

4. Синтез глицероловых эфиров бетулиновой кислоты и бетулина [88].

5. Конъюгаты полиэтиленгликоля и бетулиновой кислоты [80].

6. Сульфатирование с получением соответствующих сульфатов бетулина и их солей [89, 90]. Впервые это прием был описан в работе С. Буреевой [S. Bureeva, 2007]. Сульфатирование проводят либо смесью серной кислоты и серного ангидрида в неводной среде (пиридин и уксусный ангидрид), либо комплексом «серный ангидрид - диметилсульфоксид». Более удобной схемой сульфатирования является обработка бетулина производными хлорсульфоновой кислоты в диоксане или диметилформамиде. Для достижения необходимой растворимости обычно получают натриевые соли.

7. Получение фосфатных или фосфонатных производных бетулина [17].

Синтез ацетиленовых фосфонатов бетулина протекает через реакцию Михаэля-Арбузова с триэтилфосфином, является сложным и дорогостоящим (рисунок 1.7)

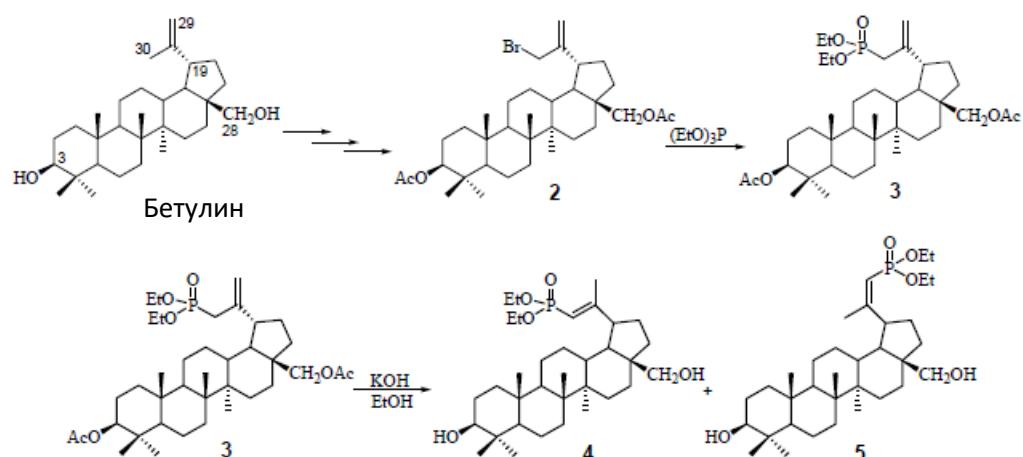


Рисунок 1.7 – Схема получения ацетиленовых фосфонатов бетулина [55].

Наибольший интерес представляют фосфатные производные ЛВ, поскольку фосфаты широко распространены в организме человека и участвуют в большинстве метаболических процессов [91]. Фосфор входит в состав нуклеотидов, нуклеиновых кислот, фосфопротеидов, фосфолипидов, фосфорных эфиров углеводов, многих коферментов и других органических соединений, а также атомы фосфора способны к образованию богатых энергией связей в макроэргических соединениях: аденозинтрифосфорной кислоте (АТФ), креатинфосфате и других.

Фосфаты ЛВ в виде солей существенно улучшают их растворимость и, соответственно, биодоступность в организме человека. Так, например, дексаметазона фосфата натриевая соль, в отличие от исходного стероида, хорошо растворима в воде. Однако, в ряде случаев излишняя растворимость дексаметазона фосфата натриевой соли вредна, и это следует учитывать при разработке новых ЛС [92].

К важным преимуществам фосфатсодержащих молекул следует отнести их высокую способность связываться с аминами, аминокислотами, амино- и NH-группами белков, что, по выражению Коттона, является неотъемлемым свойством живых систем. Природа взаимодействия фосфатов с упомянутыми азотосодержащими фрагментами разнообразна и включает в себя как образование

ковалентных и водородных связей, солеобразование, так и комплексообразование, обусловленное неспецифическим нековалентным связыванием.

Синтез фосфатных пролекарств довольно прост, и присутствие фосфатных групп обычно значительно повышает растворимость в воде. Фосфорные пролекарства, как правило, показывают прекрасную или адекватную химическую стабильность и быструю биотрансформацию до истинного ЛВ фосфатазами, присутствующими в кишечнике или в печени. В отличие от сложных эфиров карбоновых кислот, сложные эфиры фосфорной кислоты, как правило, легко гидролизуются щелочными фосфатазами, и нет никаких опубликованных данных о проблемах с фармакокинетикой в организме человека.

Улучшение растворимости в воде фосфатных пролекарств позволяет использовать их для парентерального введения в виде водных растворов, что имеет преимущества по сравнению с инъекционными методами введения или по сравнению с масляными инъекциями, имеющими много сложностей и ограничений: подогревание, только внутримышечное введение, а также **боль в месте инъекции**. Боль в месте инъекции обусловлена осаждением препарата, которое вызывает клеточный лизис и повреждение тканей. Среди фосфатных пролекарств с улучшенной биодоступностью можно упомянуть фосампренавир [83, 93], эстрамустин фосфат [94-96], преднизолон фосфат [83], флудабрин фосфат [97] для энтерального введения и фосфлуконазол [98], фосфенитоин [99, 100] и фосфат пропофола [101] – для парентерального.

Удобной методикой получения фосфатов тритерпеноидов является фосфорилирование фосфорной кислотой, оксихлоридом фосфора, пятихлористым фосфором, пирооксихлоридом фосфора, ангидридом фосфорной кислоты, аналогично синтезу фосфатных производных стероидов.

Методики получения натриевой соли фосфата преднизолона основаны на фосфорилировании основания стероида в пиридине при низких температурах пирофосфохлоридом. Обычно стараются получать фосфат стероидных гормонов в виде их натриевых солей (схема 1.2, Pat. US 3966778).

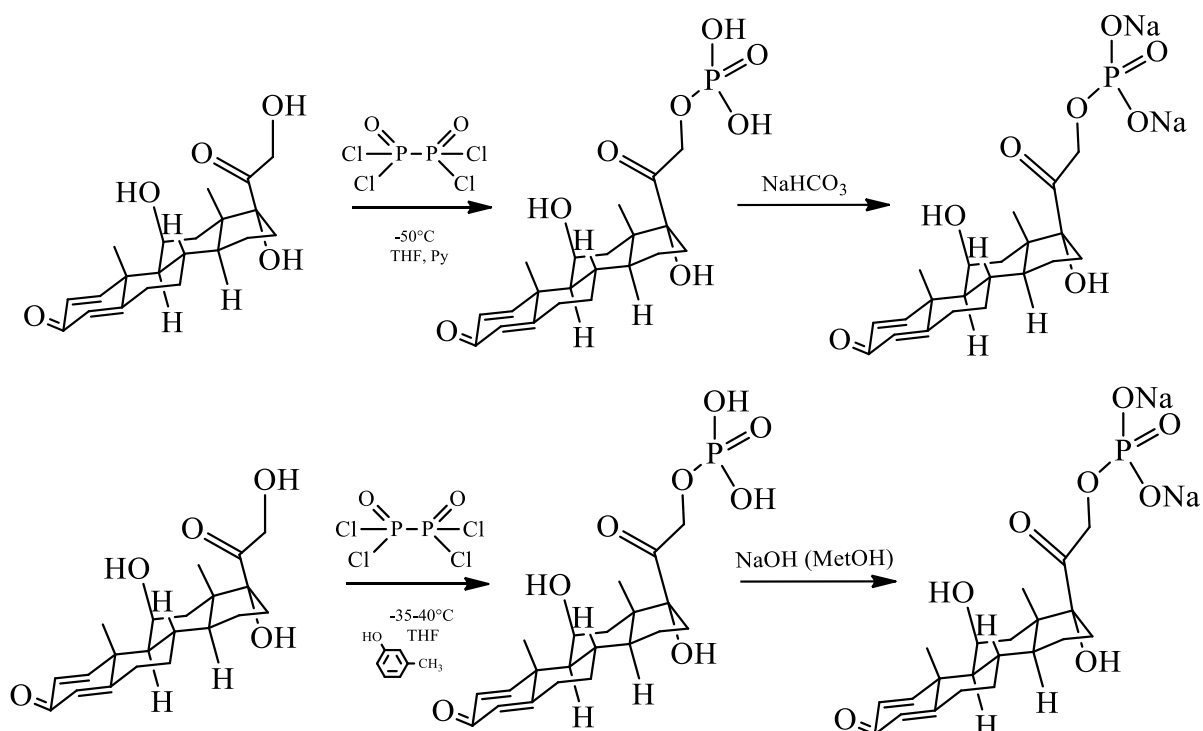


Схема 1.2 – Методики получения натриевой соли фосфата преднизолонa

Альтернативным вариантом получения фосфатов стероидов является фосфорилирование их йодсодержащего производного по С-21 (схема 1.3, Pat. US 2936313).

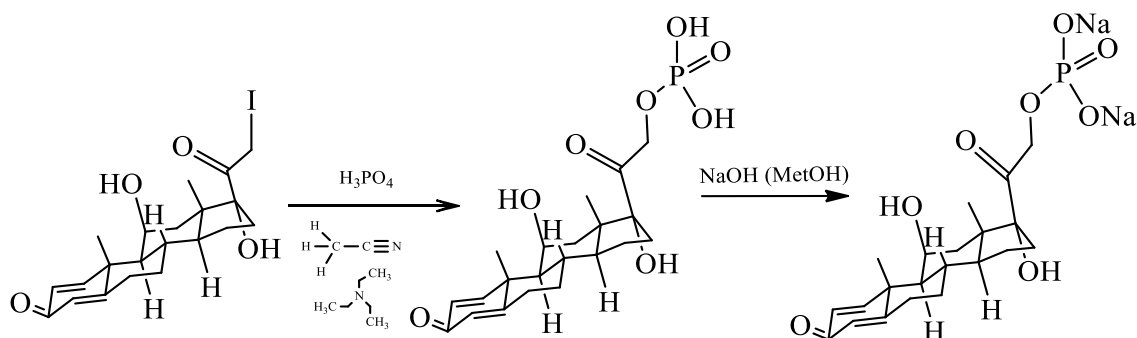


Схема 1.3 – Методики получения натриевой соли фосфата преднизолонa
через йодопроизводное

Красутским П.А. и др. описаны способы получения фосфата бетулина из дифосфодихлорида бетулина гидролизом водой с последующим переводом в натриевые соли [Patent US 6,689,767 B2, 2004]. В более ранней работе этой исследовательской группы был описан способ получения фосфата бетулина обработкой бетулина хлорокисью фосфора в неводной среде при -60°C в течение

1,5 ч с последующим выдерживанием реакционной смеси при 5-8°C в течение 10 ч и выделением продукта [А. Muhammad, 2004]. К сожалению, в литературе, как и в вышеупомянутых работах, практически отсутствуют данные по синтезу и свойствам как дифосфодихлорида бетулина, так и фосфатов бетулина.

Более трудоемкий и опасный способ получения фосфатов бетулина описан в патенте А.П. Каплуна и др. [Патент RU 2,243,233, 2004], в соответствии с которым бетулин обрабатывают хлорокисью фосфора и трихлоридом фосфора при 90-95°C в течение 24 часов в атмосфере аргона с последующей сложной модификацией. В патенте приведены данные ¹H-ЯМР спектра дифосфата бетулина: (CDCl₃-CD₃OD, 1:1, δ, мд): 0,68-1,99 (42H, 6CH₃, (CH₂)_n, м.), 3,61 (1H=CHOP, т.), 3,90 (2H, CH₂OP, д.д.), 4,55, 4,70 (2H, CH₂=C, 2с.), которые недостаточны для идентификации этого соединения.

Выводы по Главе 1

Таким образом, можно отметить, что:

1. Бетулин и его производные являются важными стратегическими объектами для медицины и фармации, как препараты анти-ВИЧ и противоопухолевого, гепатопротекторного, гиполипидемического и других видов действия.

2. Необходимой частью исследований бетулиновой кислоты или бетулина и их производных как потенциальных лекарственных веществ является изучение полиморфизма и существование структурных модификаций с различными биофармацевтическими характеристиками.

3. Особое место среди производных бетулина занимают фосфатсодержащие производные, обладающие лучшей гидрофильностью, и, соответственно, лучшей растворимостью и биодоступностью, что в свою очередь позволяет приготовить гидрофильные лекарственные формы, в том числе инъекционные.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты, материалы и методы исследования

Бетулин ($C_{30}H_{50}O_2$), чистота 99.5% (ВЭЖХ), получали из бересты березы повислой (бородавчатой) – *Betula Pendula Roth* в соответствии с методикой Кислицина А.Н. [102].

1,4-диоксан (ИМП, ГОСТ 10455-80, ОАО «Реактив»), пиридин (ЧДА, ГОСТ 13647-78, АО «Реахим»), этанол 95% (C_2H_6O , ГОСТ 51652-2000), хлорокись фосфора (ТУ: 2123-385-05763441-2002), вода деионизованная (ФС 42-0324-09), полученная на установке системы очистки воды «Elix 3» с картриджем Progard («Millipore», France), удельное сопротивление менее 0,2 мксм с рН 5.5 при температуре 20 ± 10 С использовались без предварительной очистки и какой-либо обработки, трисамин («Sigma-Aldrich», 154565-100G), лития перхлорат (ГОСТ 7791-03-9), ксимедон (НПП ФГУП «Кристалл», г. Дзержинск Нижегородской области), глутамин («Merck», TD 13015143333), натрия гидроксид (ЧДА, ГОСТ 4328-77, изм. №1,2, ЗАО «НПО ЭКРОС»).

Методы исследования и приборы

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

Хроматограммы получены на высокоэффективном жидкостном хроматографе «LC-20Avr» (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 мм, 5 мкм, Supelco), температура колонки 40 ± 1 °С. Подвижная фаза: ацетонитрил – буферный раствор KH_2PO_4 с рН 6,36 (90 : 10, об.%), скорость потока – 1,0 мл/мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Время регистрации хроматограммы 40 мин.

Спектры ЯМР ^{13}C , ^1H , ^{31}P получены на ЯМР-спектрометре «Agilent DD2 400» (Agilent Technologies, USA) и на импульсном ЯМР-спектрометре Jeol JNM-ECX400 в DMSO- d_6 , CDCl_3 и D_2O на рабочей частоте 101, 400 и 202,46 МГц, соответственно.

УФ-спектры получены в области 220–280 нм в кварцевых кюветах толщиной 10 мм на UV-Vis спектрофотометре «UV-1800» (Shimadzu, Japan).

Калориметрические измерения (ДСК) осуществлены на приборе DSC 204 F1 Phoenix (Netzsch–Gerätebau, Germany) с использованием алюминиевых тиглей в атмосфере аргона 25.0 мл/мин в температурной области от 20 до 300°C при скорости 5°C/мин.

Термографические исследования (ТГ) проведены на приборе TG 209 F1 Iris (Netzsch–Gerätebau, Germany) с использованием платиновых тиглей в атмосфере аргона в температурной области от 20 до 500°C при скорости 5 °C/мин.

Порошковые рентгеновские дифрактограммы получены на рентгеновском дифрактометре Shimadzu XRD-6000 при 295(2) К с $\text{Cu K}\alpha$ излучением ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) в геометрии отражения Брэгга-Брентано. Образцы исследовали в 2θ диапазоне 5–50° с шагом 0,026° со скоростью сканирования 0,067335 (°/с). На рентгенограммах аморфных образцов имеются дифракционные пики при 37,5° и 44,0°, которые относятся к материалу кюветы.

pH исследуемых растворов измерены на pH-метре «Mettler Toledo MP 225».

Использованы электронные аналитические весы «Shimadzu ATX-124» с $d = 0,0001 \text{ г}$, Max 120 г (Shimadzu, Japan); электронные весы A&D EK-400H с $d = 0,01 \text{ г}$, Max 200 г (USA), центрифуга «CM-6 (RPM×1000)» (ELMI, Latvia).

Квантовохимические расчеты выполнены с использованием программы HyperChem (версия 8.0) полуэмпирическим методом AM1. Для оптимизации геометрии и минимизации энергии системы был выбран алгоритм Polak-Ribiere [103].

2.2. Выделение и идентификация бетулина

Бетулин получали из бересты березы повислой (бородавчатой) *Betula Pendula Roth.*

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 дополнительно экстрагировали бересту 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. **T. пл.** 260 – 261 °C, **R_f** 0.17.

Физико-химические характеристики бетулина соответствовали литературным данным [104]:

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.):

C1	38.9	C2	27.5	C3	79.1	C4	38.9	C5	55.8	C6	18.4
C7	34.5	C8	40.4	C9	50.7	C10	37.8	C11	20.3	C12	25.7
C13	37.6	C14	42.6	C15	27.0	C16	28.9	C17	47.7	C18	48.1
C19	48.3	C20	150.4	C21	29.2	C22	33.7	C23	28.0	C24	15.6
C25	15.8	C26	16.1	C27	14.4	C28	60.6	C29	109.4	C30	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. Методика получения 3,28-дифосфата бетулина

3,28-дифосфат бетулина **ДФБ** получали фосфорилированием бетулина по первичной и вторичной спиртовым группам хлорокисью фосфора в среде органического растворителя, аналогично методикам получения фосфатов стероидов [105]. В качестве акцептора HCl использовали пиридин. Образующийся на первой стадии дифосфодихлорид бетулина в дальнейшем гидролизовали водой.

К 6,0 г бетулина (13,56 ммоль) в трехгорлой колбе добавляли 120 мл диоксана и 7,08 мл (81,6 ммоль) пиридина при комнатной температуре. В колбу по каплям добавляли 7,56 мл POCl_3 (81,6 ммоль) в 60 мл диоксана, контролируя температуру (до 25°C), перемешивали реакционную смесь 24 часа. Реакционную смесь выливали в 1000 мл дистиллированной воды со льдом, отфильтровали выпавший белый осадок и многократно промывали водой. Выделили влажный осадок, содержащий 25% воды, что соответствует гидрату 3,28-дифосфата бетулина (3,28-дифосфат бетулина $\cdot x\text{H}_2\text{O}$, где $x = 8-9$).

ИК-спектр (KBr, cm^{-1}): 3421 ш. ср. (ν -OH сп), 2331, 2342 ш. сл., 1641-1700 сл. (ν P=O), 1240 ш. ср. (δ P=O), 1031 ш. инт., 973 ш. ср. (ν C-O эф), 501 уз. ср. (ν P-O).

Спектр ^{13}C -ЯМР ДФБ (TMS, DMSO- d_6 , δ , м.д.):

C1	38.71	C2	28.27	C3	83.32	C4	38.93	C5	55.25	C6	18.36
C7	36.93	C8	40.84	C9	50.04	C10	37.42	C11	20.77	C12	25.18
C13	37.10	C14	42.66	C15	26.92	C16	29.31	C17	47.11	C18	47.62
C19	48.46	C20	150.31	C21	29.46	C22	34.13	C23	28.53	C24	16.06
C25	15.27	C26	16.51	C27	14.92	C28	63.60	C29	110.28	C30	19.19

2.4. Метод электронной спектроскопии

2.4.1. Исследование комплексообразования 3,28-дифосфата бетулина с трисамином при постоянной концентрации 3,28-дифосфата бетулина

Приготовление исходных растворов:

1.) Спиртовой $1 \cdot 10^{-3}$ М раствор 3,28-дифосфата бетулина в $1 \cdot 10^{-2}$ М спиртовом растворе лития перхлората. В мерную колбу на 100 мл поместили 0,0602 г дифосфата бетулина, 0,1064 г перхлората лития, прилили 60 мл этанола, перемешивали до полного растворения, при необходимости нагревали на водяной бане. После растворения компонентов и остывания колбы довели объем раствора этанолом до метки.

2.) Водный $4 \cdot 10^{-3}$ М раствор трисамина в $1 \cdot 10^{-2}$ М водном растворе лития перхлората. В мерную колбу на 100 мл поместили 0,0484 г трисамина, 0,1064 г перхлората лития, прилили 60 мл воды, перемешивали до полного растворения. После растворения компонентов довели объем раствора водой до метки.

Параллельно приготовили водный и спиртовой $1 \cdot 10^{-2}$ М растворы пер-хлората лития, растворив 0,1064 г перхлората лития в 100 мл воды и в 100 мл этанола соответственно.

Из исходных растворов приготовили серию исследуемых растворов.

Измеряли оптическую плотность полученных растворов на УФ-спектрофотометре в диапазоне 220-280 нм.

2.4.2. Исследование комплексообразования 3,28-дифосфата бетулина с трисамином методом изомолярных серий (Остромысленского-Жоба)

Приготовление исходных растворов:

1.) Спиртовой $1 \cdot 10^{-3}$ М раствор дифосфата бетулина в $1 \cdot 10^{-2}$ М спиртовом растворе лития перхлората. В мерную колбу на 100 мл поместили 0,0602 г дифосфата бетулина, 0,1064 г перхлората лития, прилили 60 мл этанола, перемешивали до полного растворения, при необходимости нагревали на водяной бане. После растворения компонентов и остывания колбы довели объем раствора этанолом до метки.

2.) Водный $4 \cdot 10^{-3}$ М раствор трисамина в $1 \cdot 10^{-2}$ М водном растворе лития перхлората. В мерную колбу на 100 мл поместили 0,0121 г трисамина, 0,1064 г перхлората лития, прилили 60 мл воды, перемешивали до полного растворения. После растворения компонентов довели объем раствора водой до метки.

Параллельно приготовили водный и спиртовой $1 \cdot 10^{-2}$ М растворы перхлората лития, растворив 0,1064 г перхлората лития в 100 мл воды и в 100 мл этанола соответственно.

Из исходных растворов приготовили серию исследуемых растворов.

Измеряли оптическую плотность полученных растворов на УФ-спектрофотометре в диапазоне 220-280 нм.

2.5. Метод спектрофотометрического определения общего фосфора

Приготовление реактивов [106]

1.) Приготовление восстанавливающего раствора

4,0 г ментола и 10,0 г натрия сульфита растворяли в 150 мл воды в мерной колбе вместимостью 1000 мл, прибавляли 196 г натрия метабисульфита, растворенного в 600 мл воды, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали и фильтровали. Срок годности раствора 30 суток.

2.) Приготовление насыщенного раствора натрия ацетата

420 г натрия ацетата помещали в колбу вместимостью 1000 мл воды, перемешивали и оставляли на сутки. Раствор над осадком фильтровали. Срок годности раствора 30 суток.

3.) Приготовление раствора аммония молибдата

50,0 г аммония молибдата растворяли в 500 мл воды в мерной колбе вместимостью 1000 мл, доводят объем раствора 3 М раствором серной кислоты до метки, перемешивали и фильтровали. Срок годности раствора 30 сут.

Методика спектрофотометрического определения общего фосфора с фитатом натрия в качестве стандарта. Навеску ($a_{обр}$) **Na-ДФБ** или **ДФБ** помещали в круглодонную колбу, добавляли 3 мл серной кислоты и 3 мл кислоты азотной концентрированной, далее ставили на песчаную баню ($t \sim 250^\circ\text{C}$) до обесцвечивания, затем добавляли 20 мл воды очищенной и продолжали нагревать еще 30 минут. Те же самые процедуры проводили с 0,018 г фитата натрия, содержащего 22% фосфора (Сертификат качества на субстанцию) и используемого нами в качестве стандарта.

Раствор из колб с исследуемыми веществами и стандартом переносили в мерные колбы вместимостью 100 мл, довели объем раствора водой до метки, перемешивали. 15,0 мл полученных растворов помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл, прибавляли 35 мл воды, 5 мл восстанавливающего раствора, 10 мл раствора аммония молибдата и оставляли на 10 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая. Параллельно в аналогичных условиях готовили контрольный раствор, помещая 50 мл воды в мерную колбу вместимостью 100 мл, 5 мл восстанавливающего раствора и 10 мл раствора аммония молибдата. Ровно через 10 мин в колбу с испытуемыми, стандартным и контрольным растворами прибавляли по 20 мл насыщенного раствора натрия ацетата, довели объем раствора в каждой колбе водой до метки (100 мл), тщательно перемешивали и через 20-25 мин измеряли поглощение испытуемого и стандартного растворов на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 725 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно контрольного раствора.

Расчет количественного содержания фосфора $P_{обр}$ (%) в образце проводили по следующей формуле:

$$P_x(\%) = \frac{A_x}{A_{ст}} \cdot \frac{m_{ст}(\text{г}) \cdot P_{ст}}{m_x(\text{г})} \cdot 100,$$

где:

$P_{ст} = 0,22$ – доля фосфора в стандарте фитате натрия;

$m_{ст}(\text{г})$ – масса стандарта, взятого для анализа;

$m_x(\text{г})$ – масса предварительно высушенного до постоянной массы образца: при 160°C для **Na-ДФБ** и 105°C для **ДФБ**;

A_x и $A_{ст}$ – поглощение растворов исследуемого образца и стандарта при 725 нм.

2.6. Исследования биологической активности

Все животные содержались в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рационе питания в соответствии с правилами Европейской Конвенции ET/S 129, 1986 и директивами 86/609 ESC. Проведение исследований было одобрено локальным этическим комитетом №1 ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (Приложение 6).

2.6.1. Исследования *in vitro*

Для исследований использовали кровь, стабилизированную цитратом натрия (1:9). К цельной крови добавляли растворы производных бетулина и их смесей с противоопухолевыми веществами в соотношениях 1:2; 1:5; 1:10. Эритроциты двукратно отмывали в 0,9% NaCl путем центрифугирования 10 мин при 1600g. Интенсивность ПОЛ определяли по уровню содержания вторичного продукта СРО – малонового диальдегида (MDA) – в плазме и эритроцитах методом M. Uchiyama, M. Mihara [107]. Активность СОД (SOD, EC 1.15.1.1) определяли в гемолизате отмывтых эритроцитов (1:10) по ингибированию образования продукта аутоокисления адреналина [108]. Активность лактатдегидрогеназы (LDH, EC

1.1.1.27) определяли в гемолизате отмытых эритроцитов (1:40). Каталитические свойства ЛДГ в прямой реакции (ЛДГ_{пр}) оценивали с использованием в качестве субстрата 50 мМ лактат натрия, в обратной реакции (ЛДГ_{обр}) – с использованием 23 мМ пируват натрия [109]. Расчет удельной активности ферментов осуществляли по концентрации белка, анализируемого модифицированным методом Лоури [110].

2.6.2. Исследования *in vivo*

В экспериментальной модели использовалась перевиваемая асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ). Этот вид опухоли рекомендован МЗ РФ и фармакологическим государственным комитетом для изучения противоопухолевого действия фармакологических препаратов (Хабриев, 2005).

Для формирования экспериментальной опухоли использовали клетки асцитной карциномы Эрлиха, хранившиеся в криобанке. Клетки размораживали при 37°C и трехкратно отмывали от криопротекторов в 0,15 М растворе NaCl. Далее 1 мл клеток с концентрацией 10⁷ кл./мл трансплантировали в брюшную полость мыши. На 6-е сутки после трансплантации образовавшуюся асцитическую жидкость отбирали, клетки осаждали при 400 g, трижды отмывали в 0,15 М растворе NaCl и трансплантировали в брюшную полость следующей мыши. Такие перевивки опухолевых клеток от одного животного к другому проводили 2-3 раза для разгона культуры и её стандартизации. Для эксперимента клетки из контрольного опухоленосителя подготавливали так же, как при разгоне культуры: на 6-е сутки после трансплантации из контрольного животного отбирали асцитическую жидкость, опухолевые клетки отмывали трижды в физиологическом растворе и трансплантировали в брюшную полость опытных мышей (0,8 мл, 10⁷ кл./мл).

Белые мыши самцы были разделены на 6 групп по 10 животных в каждой, n = 10 (таблица 2.1).

Таблица 2.1

Группы мышей для исследования противоопухолевой активности

Контроль	Интактные животные
Контроль АКЭ	Мыши АКЭ-носители
АКЭ-5-ФУ	Мыши АКЭ-носители, которым вводили внутривентриально 5-ФУ раз в день
АКЭ-ГС	Мыши АКЭ-носители, которым вводили внутривентриально ГС раз в день
АКЭ-(ДФБ+5-ФУ)	Мыши АКЭ-носители, которым вводили внутривентриально комбинированный препарат ДФБ с 5-ФУ раз в день
АКЭ-(ДФБ+ГС)	Мыши АКЭ-носители, которым вводили внутривентриально комбинированный препарат ДФБ с ГС раз в день

На 11-й день все мыши были убиты путем декапитации под наркозом (Золетил 60 мг·кг⁻¹, Ксила 6 мг·кг⁻¹), асцитическая жидкость была собрана из перитонеальной полости. Объем жидкости измеряли, собирая ее в градуированную пробирку для центрифугирования.

Цитологический анализ клеток в асцитической жидкости проводили с использованием метода Паппенгейма с окрашиванием азур-эозином и с последующей обработкой 10% раствором формалина [111].

Объем введения лекарственного средства составлял 0,2 мл, содержащего 1,5 мг ДФБ в виде его натриевой соли. Доза 5-ФУ и ГС составила 0,32 мг на мышшь (таблица 2.2).

Таблица 2.2

Составы лекарственных форм

Группа	ЛВ*	ДФБ
АКЭ-ГС	ГС – 48 мг	-
АКЭ-5-ФУ	5-ФУ – 48 мг	-
АКЭ-(ДФБ+ГС)	ГС – 64 мг	200 мг
АКЭ-(ДФБ+5-ФУ)	5-ФУ – 64 мг	200 мг

* добавляли воды до 32 мл

ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований. ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ НАТРИЕВОЙ СОЛИ И СОЛЕВЫХ КОМПЛЕКСОВ 3,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА

Анализ литературных данных показал, что бетулин и его производные способны существовать в различных структурных модификациях, в том числе полиморфных или сольватополиморфных формах, которые обладают различными свойствами по растворимости и, соответственно, биодоступности.

В настоящее время поиск новых производных бетулина с определенной фармакологической активностью сосредоточен как на химической модификации полусинтетических производных, так и на улучшении их растворимости в воде или биодоступности, в частности путем получения их фосфатсодержащих производных [17, 112, 113].

3.1. Получение и исследование физико-химических свойств натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина

Удобным приемом повышения гидрофильности производных бетулина является их модификация фосфатными и фосфонатными группами, с последующим возможным переводом в солевые формы [114, 115].

3.1.1. Свойства структурных модификации 3,28-дифосфата бетулина

Анализ образцов 3,28-дифосфата бетулина (ДФБ), синтезированных в лаборатории кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО "ПИМУ" Минздрава России показал, что полученные образцы, имея один и тот же

элементный состав, отличались по растворимости, температуре плавления, имели разные ИК- и УФ-спектры.

В связи с этим нами изучено влияние различных факторов при получении 3,28-дифосфата бетулина на его свойства и структуру.

За основу метода синтеза нами принята методика получения и выделения фосфатов стероидных гормонов [105] по реакции фосфорилирования бетулина с использованием оксихлорида фосфора и пиридина в качестве акцептора HCl при молярном отношении реагентов 1:6:6 в среде диоксана (схема 3.1).

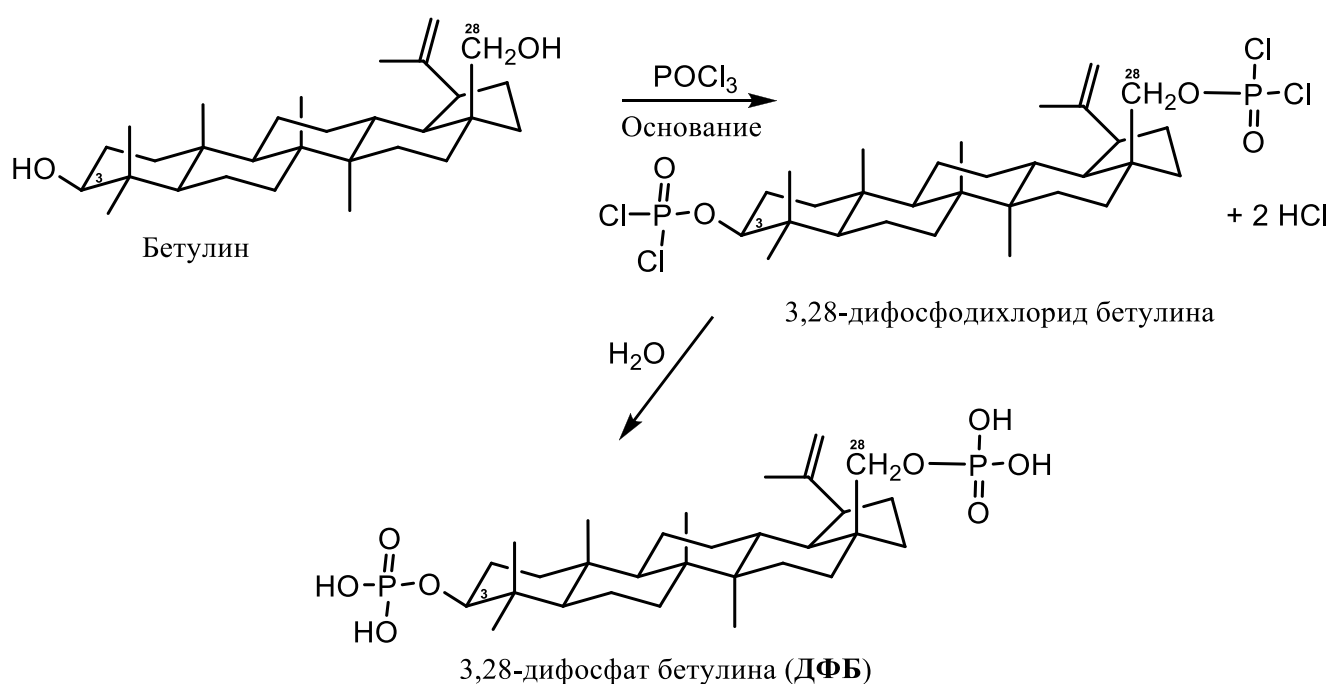


Схема 3.1 – Синтез 3,28-дифосфата бетулина

Продукт реакции представлял собой белый порошок в виде сольвата ДФБ, общей формулой ДФБ·xH₂O·у диоксан, где x = 1-9.

Нами показано, что порошок представлен двумя основными структурными модификациями, имеющими один и тот же состав, но различающиеся по растворимости в этаноле. Первый тип ДФБ (ДФБ-1) хорошо растворялся в этаноле (до 100 г/л), имел температуру плавления 147-148°C, тогда как вторая форма ДФБ-2 была плохо растворим в этаноле, его температура плавления соответствовала 156-160°C.

ИК-спектры образцов **ДФБ-1** и **ДФБ-2** также отличались не только в области «отпечатков пальцев», а также в области, отвечающей валентным колебаниям фосфорильных – P=O 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 (рисунок 3.1.).

Кроме того, когда образцы **ДФБ** подвергались старению при хранении на воздухе, они сохраняли свой элементный состав (рисунок 3.2.).

Такое различие в свойствах можно объяснить способностью димеров **ДФБ**, характерных для производных бетулина, включать в свою структуру молекулы растворителя (этанол, вода, диоксан) [59].

Для удаления молекул растворителя из структуры **ДФБ** проведены эксперименты по модификации осадка **ДФБ** кипячением в воде, высаживанием растворителем – ацетоном, не включающимся в бетулиновую структуру [114]. Кроме того, получен образец **ДФБ** воздействием водного раствора HCl на его натриевую соль. Растворимость в этаноле модифицированных образцов **ДФБ** снижалась практически в 10 раз.

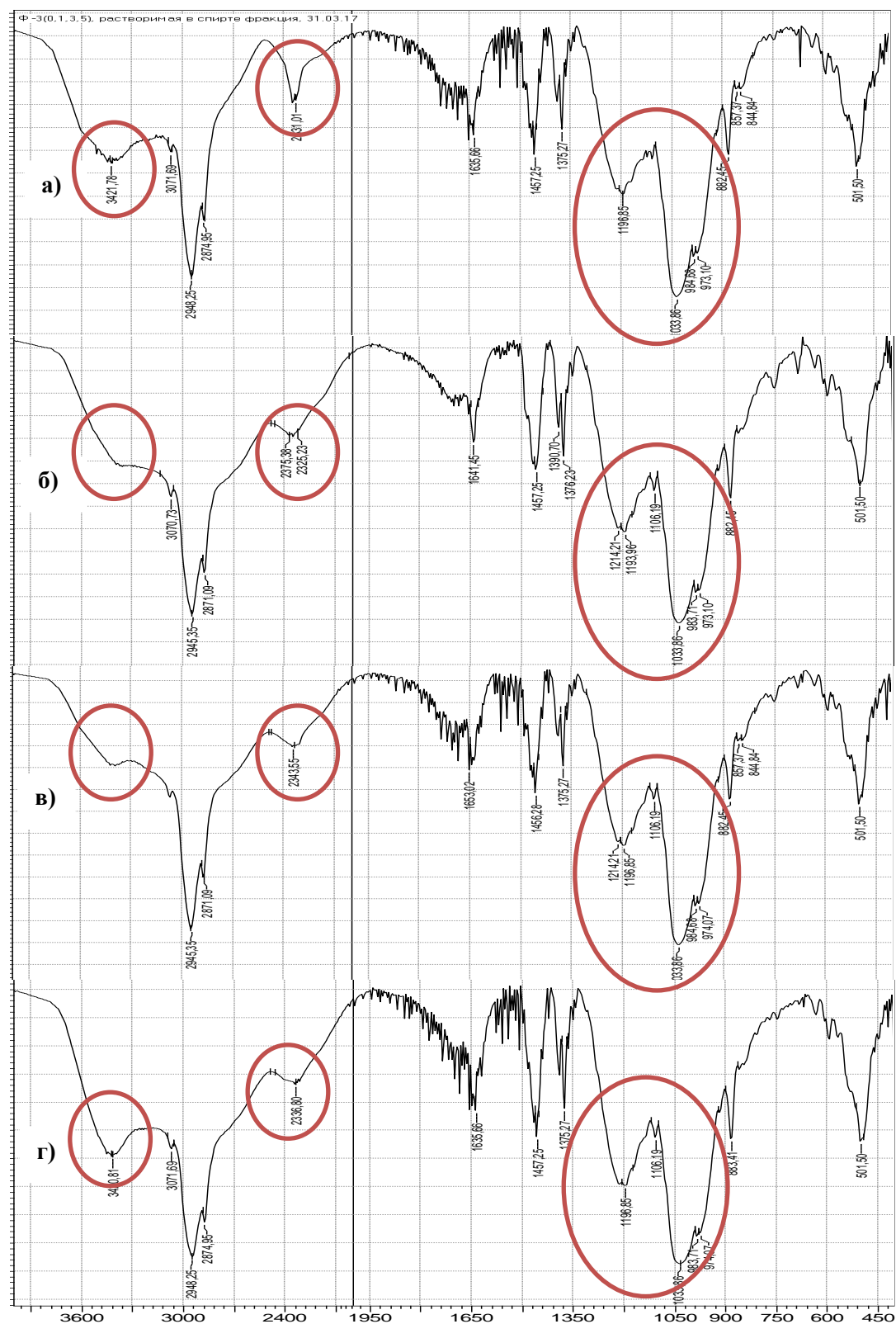


Рисунок 3.1 – ИК-спектры ДФБ: фракции, хорошо растворимой в спирте (а); фракции, осажденной ацетоном из спиртового раствора (б); ДФБ, подвергавшийся кипячению в воде в течение 1 ч (в); ДФБ, полученный путем обратного синтеза из Na-ДФБ (г)

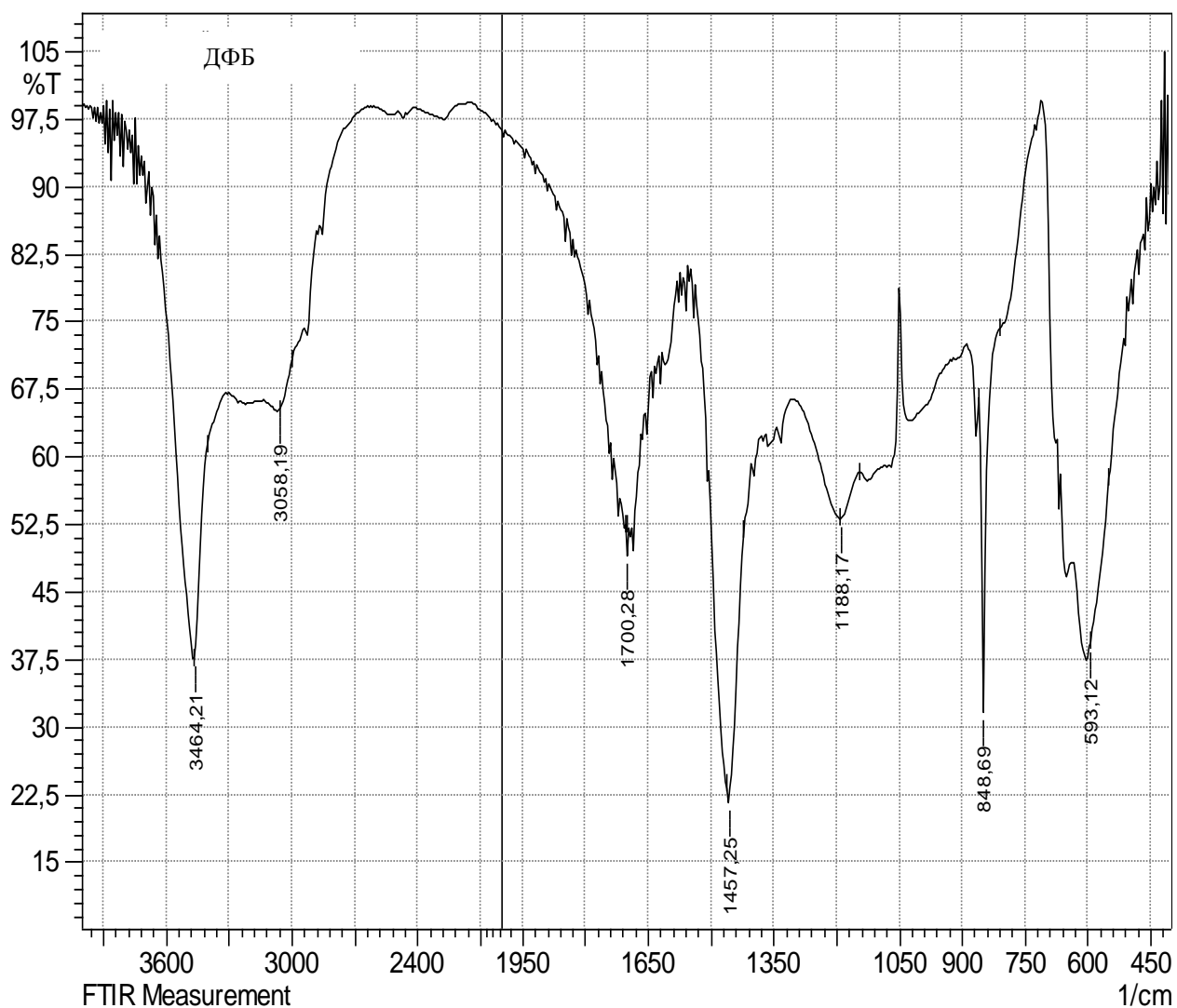


Рисунок 3.2 – ИК-спектр образца ДФБ, подвергнувшегося старению при хранении на воздухе

Структурные модификации ДФБ-1 и ДФБ-2 имели разные теплофизические характеристики. Для хорошо растворимого в этаноле образца ДФБ-1, ТГ-кривая имеет ступень, характеризующую потерю массы 7% в температурном интервале 72-150°C (рисунок 3.3а, таблица 3.1).

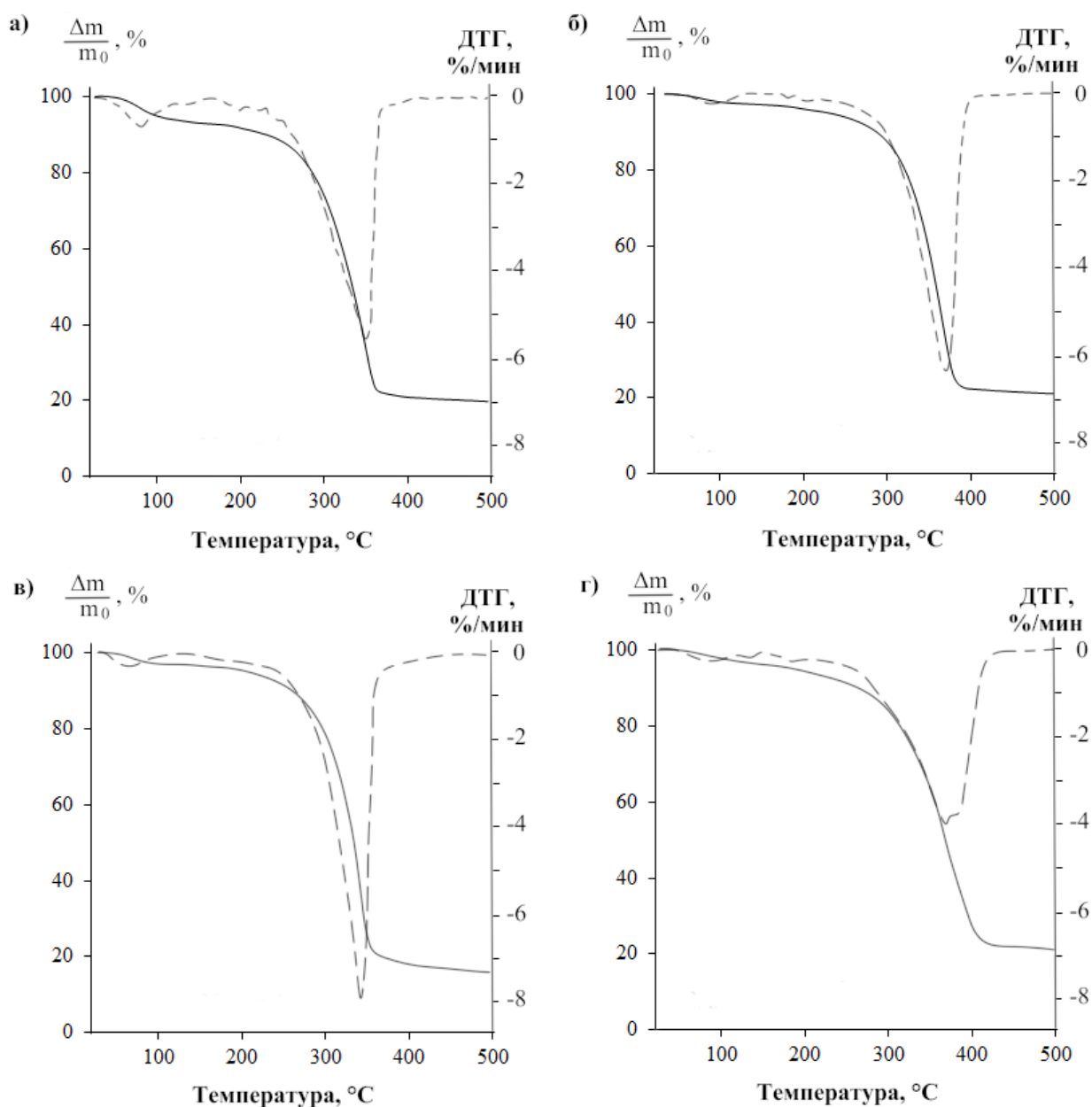


Рисунок 3.3 – ТГ-кривые ДФБ-1 (а) и ДФБ-2 (б,в,г)

Вероятно, это соответствует удалению молекул растворителя из кристаллов (при стехиометрии ДФБ : растворитель 1:1). В отличие от этого, ТГ-кривая образцов ДФБ-2, полученных осаждением ацетоном из спиртового раствора, обработкой продукта кипячением в воде и обратным синтезом из натриевой соли ДФБ, не имеет ступени в данном температурном интервале, что свидетельствует об отсутствии молекул растворителя в образце (рисунок 3.3б,в,г, таблица 3.1).

Таблица 3.1

Термоаналитическая характеристика образцов 3,28-дифосфатов бетулина
(данные ТГ-анализа)¹

Рисунок	ДФБ	Образец ДФБ	Начало ступени, °С	Конец ступени, °С	Δm , %
а	1	Осадок (синтез в диоксане), легко растворимый в этаноле до 100 г/л	72,3	175,8	5,31
			219,1	475,8	70,71
б	2	Осадок (синтез в диоксане), осажденный ацетоном из этанольного раствора	97,4	458,6	70,39
в	2	Осадок (синтез в диоксане), после кипячения 1 ч в воде	78,0	450,1	81,54
г	2	Синтез из Na-ДФБ ²	99,9	435,0	76,00

Примечания:

¹ Стандартная неопределенность температуры $u(T) = 0,5^\circ\text{C}$

² ДФБ получен обработкой **Na-ДФБ** 0,1М водным раствором HCl

Более детально анализ структурных модификаций ДФБ был проведен с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

ДСК-кривая **ДФБ-1** имеет два основных пика, характеризующих экзотермические эффекты. Первый процесс реализуется в температурном интервале $151,2-155,9^\circ\text{C}$, $\Delta H_1 = 15,49$ кДж/моль; второй – $183,5-200,8^\circ\text{C}$, $\Delta H_2 = 19,66$ кДж/моль (рисунок 3.4а, таблица 3.2).

Для **ДФБ-2**, переосажденного ацетоном из этанольного раствора, экзотермические эффекты проявляются в температурных интервалах $161,3-172,8^\circ\text{C}$, $\Delta H_1 = 23,52$ кДж/моль; и $185,9-197,3^\circ\text{C}$, $\Delta H_2 = 70,53$ кДж/моль (рисунок 3.4б, таблица 3.2).

На ДСК-кривых разных образцов максимум первого пика экзотермического эффекта изменялся в пределах $150 \pm 13^\circ\text{C}$, а максимум второго пика в пределах $193 \pm 8^\circ\text{C}$ (таблица 3.2). Величина энтальпии ΔH первого экзотермического эффекта для всех образцов варьировалась от 10,00 до 23,52 кДж/моль, а величина ΔH второго экзотермического эффекта сильно зависела от структурной модификации.

Величина ΔH составляла 19,66 кДж/моль для ДФБ-1, а ΔH экзотермического эффекта ДФБ-2 колеблется от 67,09 до 80,42 кДж/моль (таблица 3.2).

Полученные результаты позволяют использовать величину энтальпии второго экзотермического эффекта, наряду с растворимостью и $T_{пл}$, как отличительный признак структурной модификации ДФБ-1 от ДФБ-2.

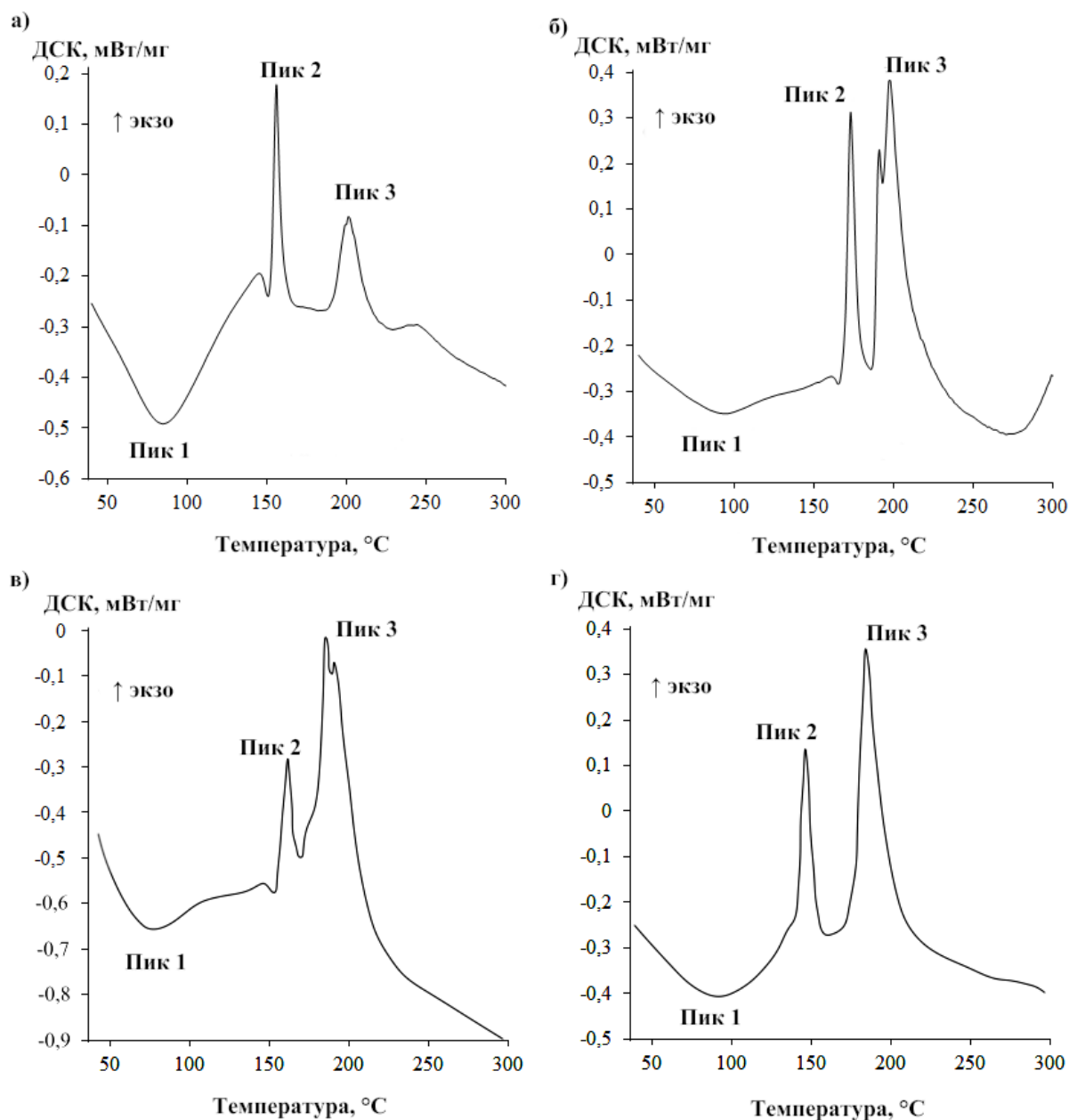


Рисунок 3.4 – ДСК-кривые ДФБ-1 (а) и ДФБ-2 (б,в,г)

Таблица 3.2

Термоаналитическая характеристика образцов 3,28-дифосфата бетулина
(данные ДСК-анализа)¹

ДФБ		Образец	Пик 1	Пик 2		Пик 3			
			T _{peak} , °C	T _{onset} , °C	T _{peak} , °C	Экзо-эффект ΔH, кДж/моль (Дж/г)	T _{onset} , °C	T _{peak} , °C	Экзо-эффект ΔH, кДж/моль (Дж/г)
1	а	Осадок (синтез в диоксиде), легко растворимый в этаноле до 100 г/л	85.3 ± 0.5	151,2 ± 0,5	155,9 ± 0,5	15,5 ± 0,2 (25,7 ± 0,3)	183,5 ± 0,5	200,8 ± 0,5	19,7 ± 0,2 (32,7 ± 0,3)
2	б	Осадок (синтез в диоксиде), осажженный ацетоном из этанольного раствора	77.0 ± 0.5	161,3 ± 0,5	172,8 ± 0,5	23,5 ± 0,2 (35,5 ± 0,4)	185,9 ± 0,5	197,3 ± 0,5	70,5 ± 0,7 (117,2 ± 1,2)
	в	Осадок (синтез в диоксиде), после кипячения 1 ч в воде	90.8 ± 0.5	143,2 ± 0,5	161,0 ± 0,5	10,0 ± 0,1 (16,6 ± 0,2)	171,0 ± 0,5	185,1 ± 0,5	80,4 ± 0,8 (133,6 ± 1,3)
	г	Синтез из Na-ДФБ ²	94.1 ± 0.5	137.5 ± 0,5	148,5 ± 0,5	21,4 ± 0,2 (39,1 ± 0,4)	164,2 ± 0,5	187,3 ± 0,5	67,1 ± 0,7 (111,4 ± 1,1)

Примечания:

¹ Стандартная неопределенность температуры $u(T) = 0,5^\circ\text{C}$. Комбинированная расширенная неопределенность для энтальпий переходов $U_{c,r}(\Delta H_{tr}^\circ)$ равна 0,01

² ДФБ получен обработкой Na-ДФБ 0,1М водным раствором HCl

Данные рентгеновской порошковой дифрактометрии показали, что изучаемые образцы ДФБ являются рентгеноаморфными.

Таким образом, 3,28-дифосфат бетулина, полученный фосфорилированием бетулина с использованием POCl_3 , имеет две основные структурные формы (ДФБ-1 и ДФБ-2), которые отличались растворимостью в этаноле, температурой плавления, Фурье-ИК-спектрами, термоаналитическими характеристиками. Экзо-эффекты при $193 \pm 8^\circ\text{C}$ для этанол-растворимых образцов ДФБ-1 ($-19,7 \pm 0,2$ кДж/моль) были примерно в три раза меньше, чем для нерастворимых в этаноле образцов ДФБ-2 ($-70,5 \pm 0,7$ кДж/моль).

3.1.2. Получение натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина

Натриевые соли эфиров фосфорной кислоты стероидных гормонов, например, дексаметазона, получают обработкой щелочными растворами гидроксида натрия или соды различной концентрации и их выделением в различных условиях (лиофильная сушка, присутствие криопротекторов) [115].

Потенциометрическое титрование этанольного $1 \cdot 10^{-2}$ М раствора ДФБ 0,2-4,0М растворами щелочей показало, что взаимодействие ДФБ с NaOH происходит в две ступени, а стехиометрия титрования 1:2 и 1:4. На рисунке 3.5 приведена типичная кривая титрования этанольного $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора ДФБ 0,2М водным раствором NaOH $pH = f(V)$ и ее дифференциальная форма $\Delta pH / \Delta V = f(V)$.

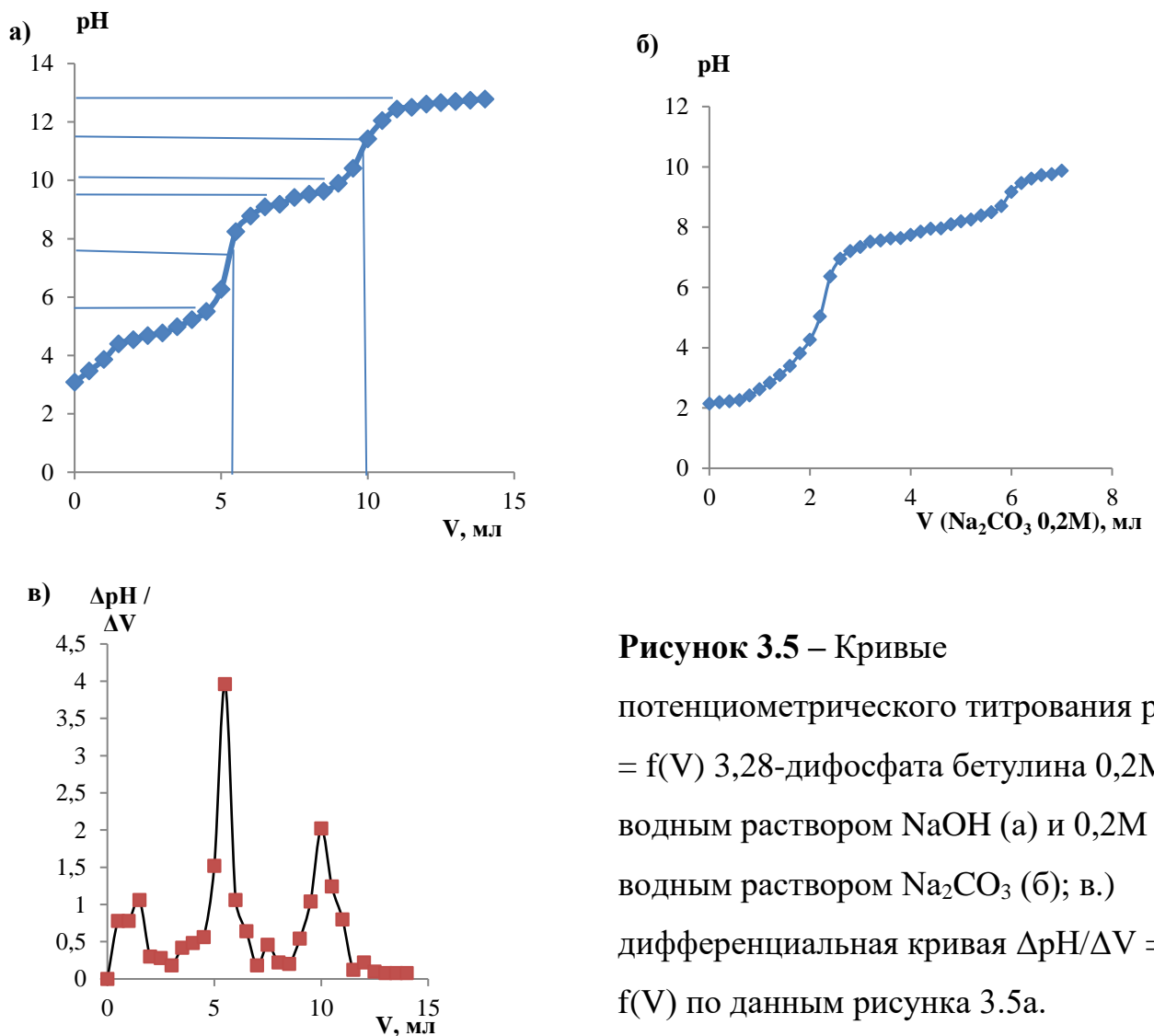


Рисунок 3.5 – Кривые
потенциометрического титрования $pH = f(V)$ 3,28-дифосфата бетулина $0,2M$ водным раствором NaOH (а) и $0,2M$ водным раствором Na_2CO_3 (б); в.) дифференциальная кривая $\Delta pH / \Delta V = f(V)$ по данным рисунка 3.5а.

На рисунке 3.5б продемонстрирована зависимость $pH = f(V)$ при титровании 0,2М водным раствором Na_2CO_3 10 мл водной суспензии, содержащей 0,5 ммоль ДФБ. Поскольку раствор соды не дает необходимый pH для полного перевода в тетранатриевую соль ДФБ, динатриевую соль ДФБ, являющуюся продуктом замещения протонов в фосфатных группах при С-28 и С-3 удобнее получать воздействием водного раствора Na_2CO_3 на водную суспензию ДФБ.

ИК-спектры продуктов, выделенных при pH 7, 8, 9 и 10, отличались, и «кислотный горб» в области 2400 см^{-1} уменьшался с увеличением pH, а также изменялся характер полосы в области $1650\text{-}1700\text{ см}^{-1}$, характеризующей валентные колебания P=O группы (рисунок 3.6).

Натриевую соль **Na-ДФБ** в виде белого кристаллического порошка получали добавлением раствора NaOH к спиртовому раствору ДФБ до pH 7-10. Свежеприготовленный осадок **Na-ДФБ** содержит ~10% воды и хорошо растворяется в воде – до 10 г/л, что в 10^6 раз превышает растворимость бетулина и в 10^4 раз растворимость ДФБ. При сушке растворимость **Na-ДФБ** уменьшалась.

Количественное содержание фосфора (7,05-7,45%) и воды (16,80-17,27%) в свежеприготовленных образцах **Na-ДФБ** позволяют предположить брутто-формулу кристаллогидрата – **Na-ДФБ** · 8H₂O.

Структура полученного продукта доказывалась ЯМР-спектрами (рисунок 3.7). В ¹³C-ЯМР спектре наблюдалось смещение сигналов при С-3 и С-28. ³¹P-ЯМР спектр содержит сигналы фосфора при С-3 в виде дублета ($\delta = -0,61$ м.д., $J = 8,4$ Гц) и С-28 в виде неразрешенного триплета ($\delta = 0,28$ м.д.) в DMSO-d₆, а в D₂O сигналы, равные С-3 ($\delta = 4,28$ м.д., $J=8,6$ Гц) и С-28 ($\delta = 5,47$ м.д.). Значения химических сдвигов зависели от молярного соотношения ДФБ и гидроксида натрия (1:2 или 1:4) при приготовлении **Na-ДФБ**.

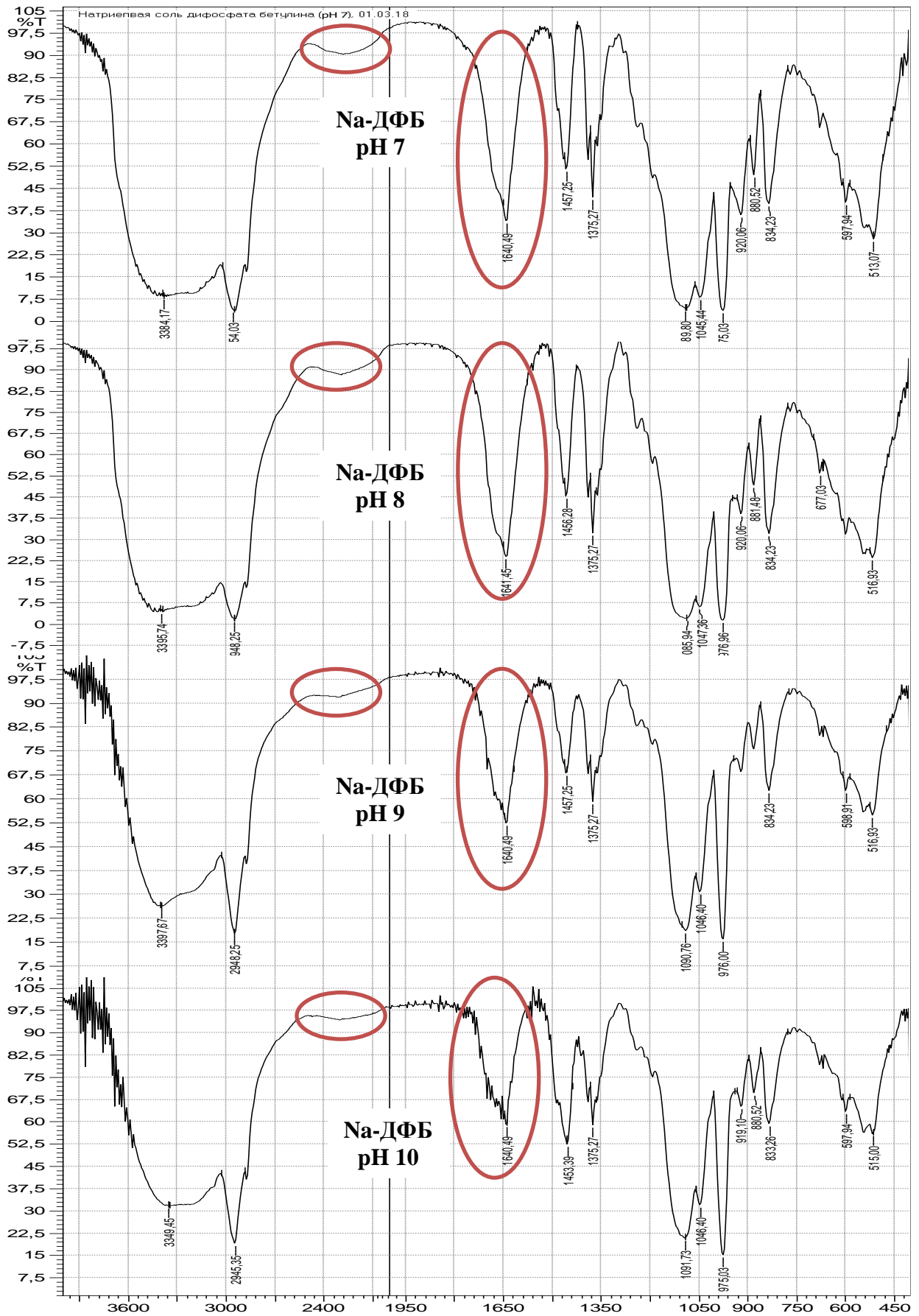
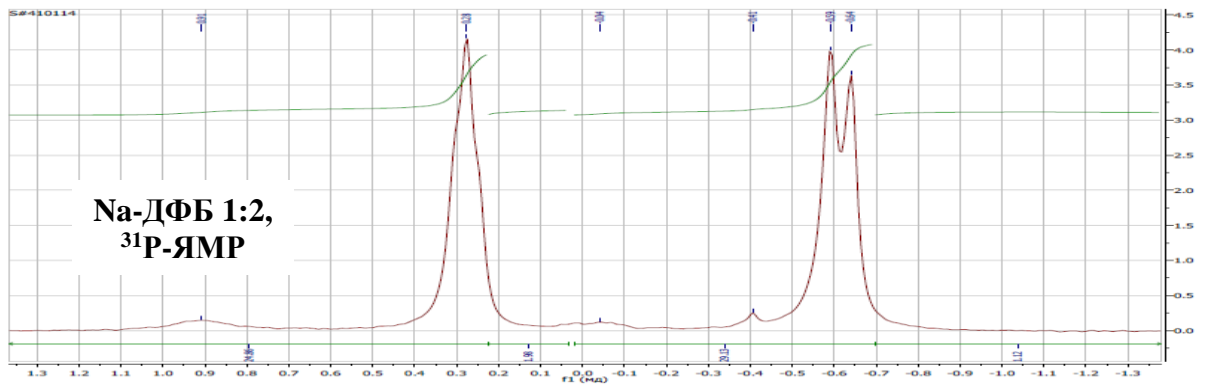
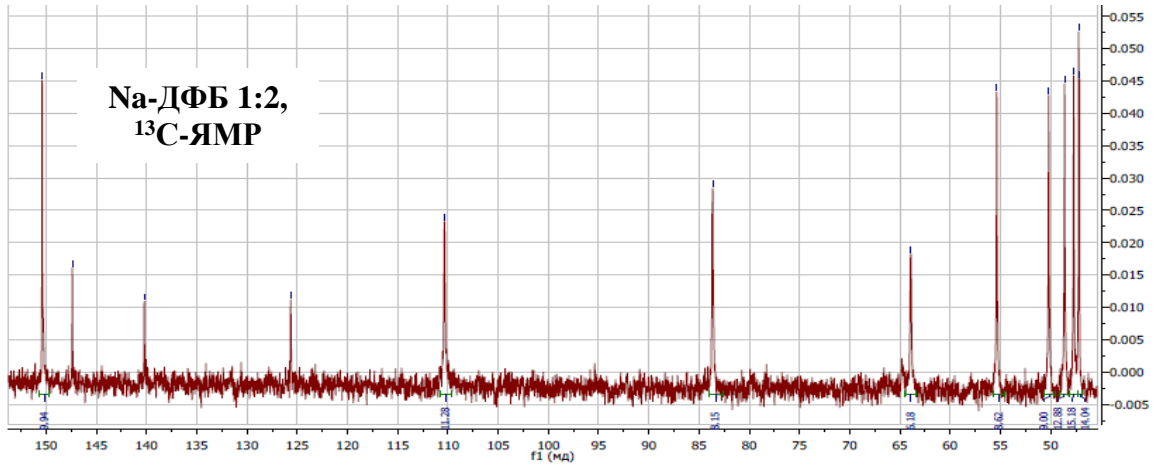
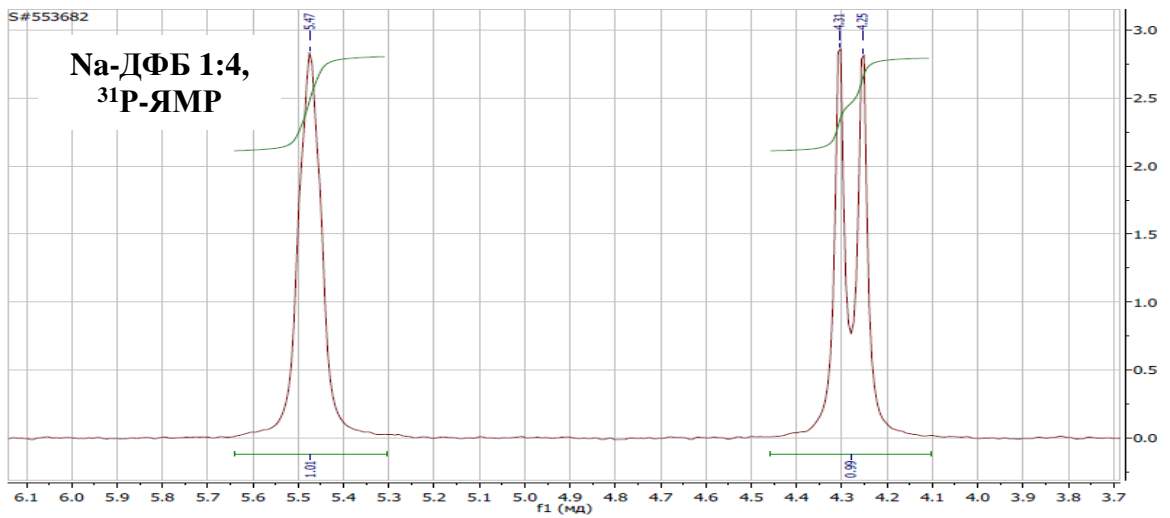


Рисунок 3.6 – ИК-спектры натриевых солей 3,28-дифосфата бетулина, полученных при pH 7, 8, 9, 10



DMCO



D₂O

Рисунок 3.7 – ЯМР-спектры натриевых солей ДФБ, полученных при разных соотношениях ДФБ:NaOH

Порошковые рентгеновские дифрактограммы были получены на рентгеновском дифрактометре Shimadzu XRD-6000 при 295(2) К с $\text{CuK}\alpha$ излучением ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), с использованием отражательной геометрии Брегга-Брентано. Образцы были сняты в 2θ интервале $5\text{-}50^\circ$ с шагом 0.026° , при скорости сканирования $0.067335 \text{ (}^\circ/\text{с)}$. На порошковых рентгеновских дифрактограммах аморфных образцов есть пики при 37.5° и 44.0° , которые относятся к материалу кювет.

Водорастворимый **Na-ДФБ-1** был получен в виде игольчатых кристаллов в отличие от слабокристаллического **Na-ДФБ-2**, тогда как **ДФБ-1** и **ДФБ-2** со временем подвергались старению и были выделены в виде аморфного вещества в соответствии с данными рентгеновской порошковой дифрактометрии (рисунок 3.8).

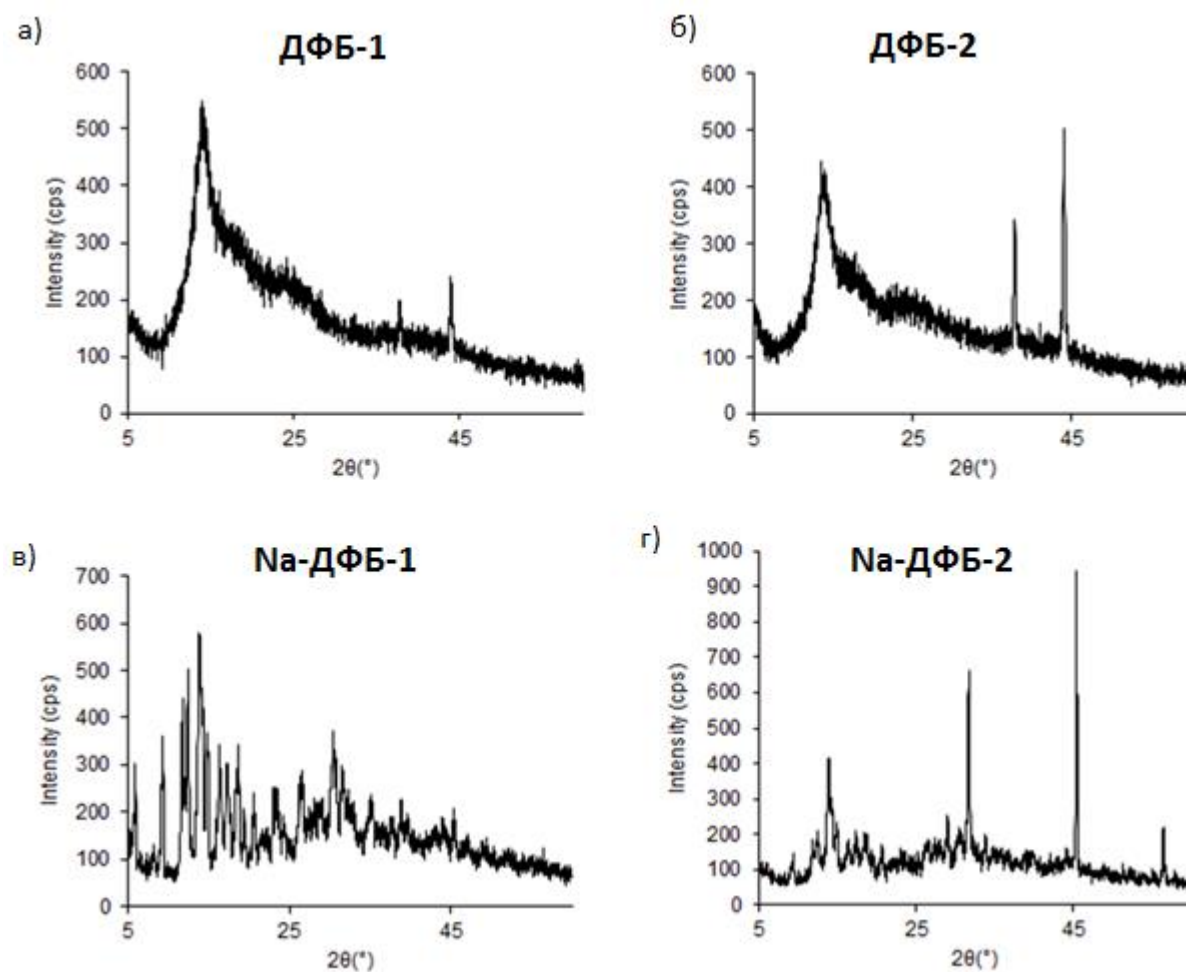


Рисунок 3.8 – Данные рентгеновской порошковой дифрактометрии образцов **ДФБ-1** (а), **ДФБ-2** (б), **Na-ДФБ-1** (в) и **Na-ДФБ-2** (г)

Следует отметить, что аморфные образцы имеют бимодальное молекулярно-массовое распределение, о чем свидетельствует сложная форма пика при малых углах.

ДСК-кривые **Na-ДФБ** характеризуют эндотермический эффект с максимумом при 95,7-111,7°C (рисунок 3.9), вероятно, обусловленный удалением связанных молекул воды в гидратах **Na-ДФБ**.

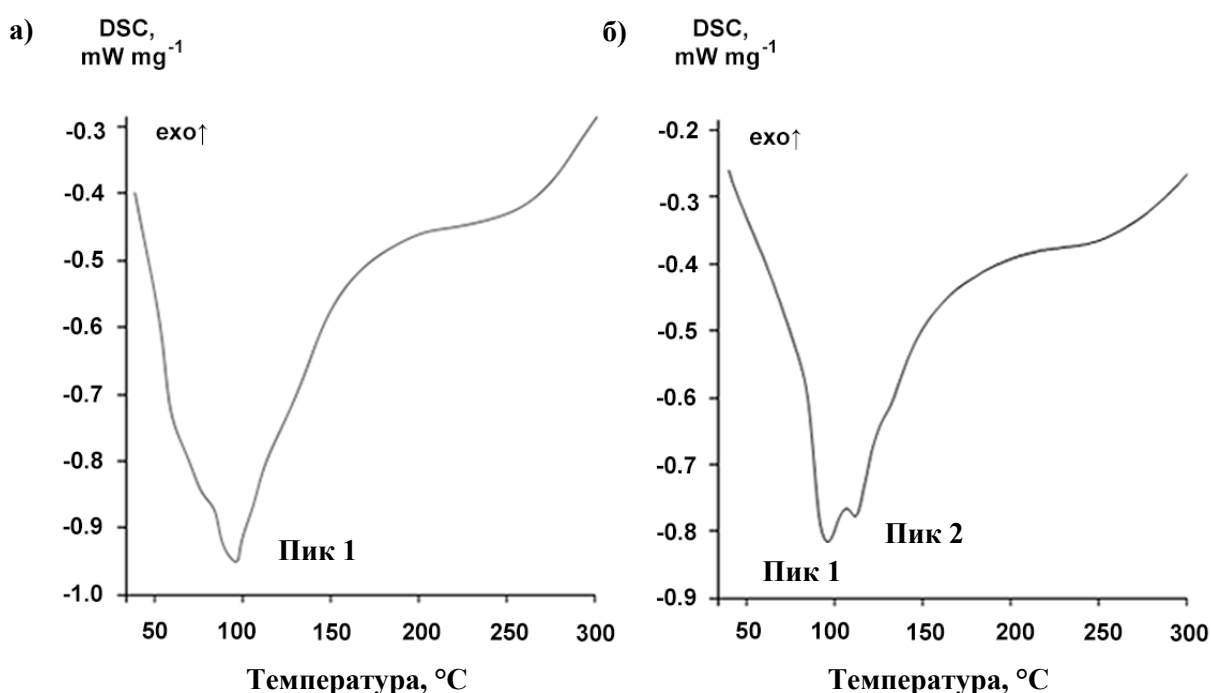


Рисунок 3.9 – ДСК-кривые натриевых солей 3,28-дифосфата бетулина: (а) **Na-ДФБ-1**; (б) **Na-ДФБ-2**. Число повторений эксперимента составляло 4.

Эндо-эффект образца **Na-ДФБ-1** проявлялся при 95,7°C, а образца **Na-ДФБ-2** при 96,4 и 111,7°C.

На кривой термогравиметрического анализа натриевой соли **ДФБ** (рисунок 3.10, таблица 3.3) видны две ступени, первая из которых также соответствует потере воды – 16,40-16,55% от всей массы, что составляет 7,5 молекул воды на одну молекулу натриевой соли дифосфата бетулина.

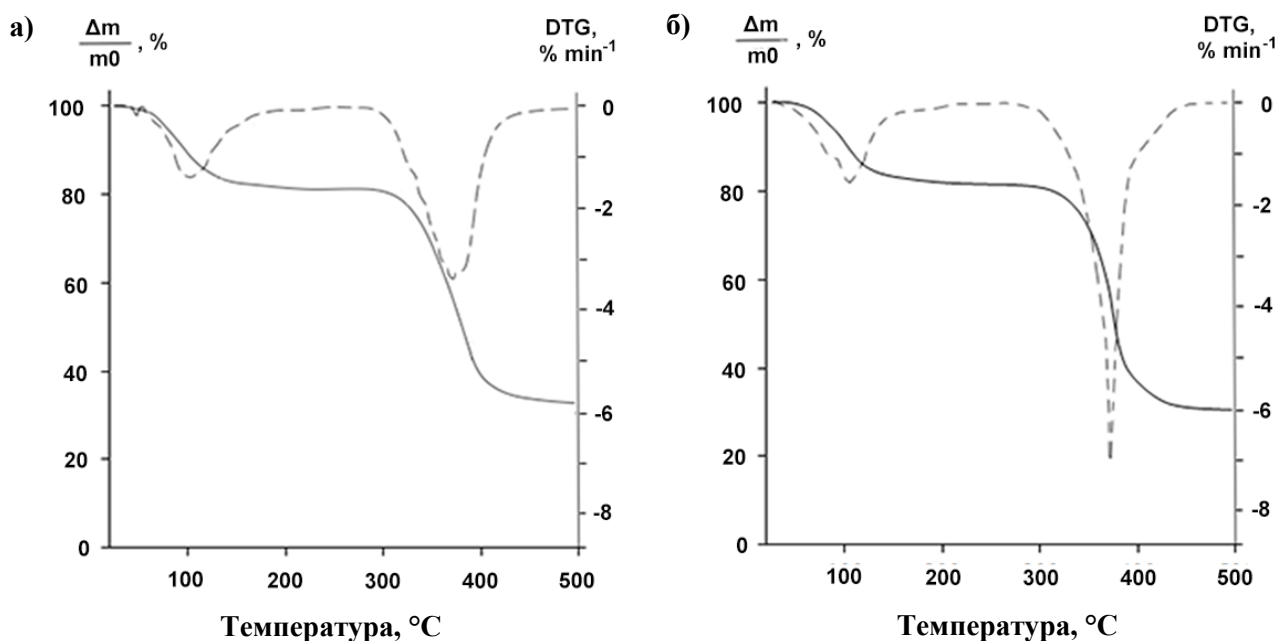


Рисунок 3.10 – ТГ (сплошная линия) и ДТГ (пунктирная линия) кривые натриевых солей 3,28-дифосфата бетулина: (а) **Na-ДФБ-1**; (б) **Na-ДФБ-2**. Число повторений эксперимента составляло 4.

Таблица 3.3

Характеристика термогравиметрических кривых образцов натриевых солей 3,28-дифосфата бетулина ¹

Образец	Начало ступени, °С	Конец ступени, °С	Δm, %
Na-ДФБ-1	63,8	253,7	16,55
	315,4	486,2	46,30
Na-ДФБ-2	69,3	240,0	16,40
	318,3	455,9	48,40

Примечания:

¹ Стандартная неопределенность температуры $u(T) = 0,5^\circ\text{C}$.

Этот эффект может быть связан с удалением не только кристаллизационной воды из структуры гидрата, но также воды, окклюзированной в кристаллической решетке или между зернами твердого

тела. Процесс потери воды в кристаллогидрате **Na-ДФБ** приводит к потере его растворимости в воде в процессе хранения.

Выводы по разделу 3.1:

Таким образом, 3,28-дифосфат бетулина, полученный фосфорилированием бетулина с использованием POCl_3 , имеет две основные структурные формы (**ДФБ-1** и **ДФБ-2**), которые отличались растворимостью в этаноле, температурой плавления, Фурье-ИК-спектрами, термоаналитическими характеристиками, Экзо-эффекты при $193 \pm 8^\circ\text{C}$ для этанол-растворимых образцов **ДФБ-1** ($-19,7 \pm 0,2$ кДж/моль) были примерно в три раза меньше, чем для нерастворимых в этаноле образцов **ДФБ-2** ($-70,5 \pm 0,7$ кДж / моль).

Водорастворимый **Na-ДФБ-1** был получен в виде игольчатых кристаллов в отличие от слабокристаллического **Na-ДФБ-2**, соли характеризовались эндо-эффектами при $95-112^\circ\text{C}$.

Теплофизические свойства **ДФБ** и **Na-ДФБ**, ИК и ЯМР характеристики необходимо учитывать при контроле качества этих субстанций в разделе идентификации.

3.2. Получение и свойства солевых комплексов 3,28-дифосфата бетулина с аминами (трисамин, ксимедон, меглумин)

Альтернативным приемом повышения биодоступности является получение ионных солевых форм базовых субстанций. Кроме того, лиганд, используемый для образования солевого комплекса, может иметь самостоятельную фармакологическую активность, дополняющую действие активного действующего вещества. В случае, если активное действующее вещество является сложной органической молекулой, как в случае 3,28-дифосфата бетулина, склонного к димеризации, оно также способно выступать в качестве вектора доставки для лиганда. В последнем случае лиганд может быть лекарственным веществом, защищенным от окисления, его доза может быть снижена, что особенно актуально в случае токсичных веществ.

3.2.1. Исследование кислотно-основных свойств 3,28-дифосфата бетулина УФ-спектральным методом

Для 3,28-дифосфата бетулина в качестве лигандов можно предложить азотосодержащие соединения основного характера, поскольку комплексообразование фосфатной группы с аминами, аминокислотами, аминами- и NH-группами белков весьма эффективно за счет как ковалентного и ионного, так и неспецифического нековалентного связывания [116, 117].

Учитывая кислотные свойства фосфатной группы ДФБ, в работе нами использованы в качестве лиганов амины с антиацидотическим действием, такие как трисамин (триметамол, 3-(оксиметил)-аминометан), меглумин (глюкамин, (2R,3R,4R,5S)-6-(метиламино)гексан-1,2,3,4,5-пентол), а также слабое основание с репаративными свойствами – ксимедон (1-(β-оксиэтил)-4,6-диметил-1,2-дигидро-2-оксипиримидин). Образование комплексов в значительной степени определяется

способностью **ДФБ** к ионизации, поэтому на первой стадии работы мы исследовали кислотно-основные свойства **ДФБ**.

Последовательные стадии ионизации остатков фосфорной кислоты в **ДФБ** приводят к отщеплению двух протонов на каждую фосфатную группу, причем основной процесс происходит на первой стадии (схема 3.2).

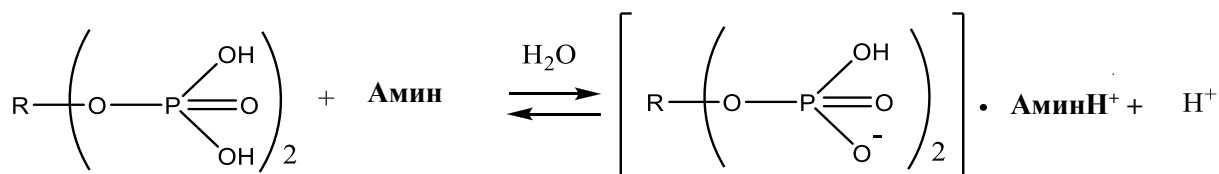
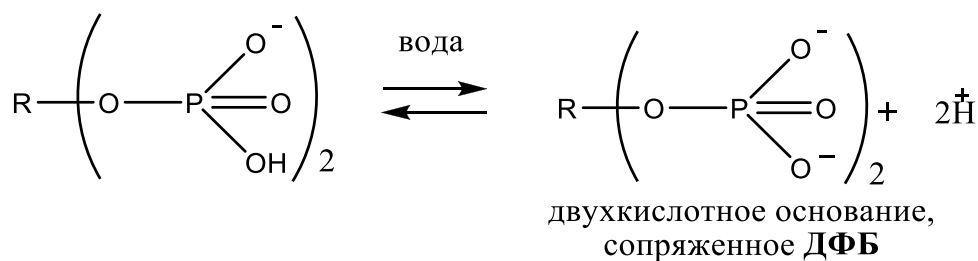
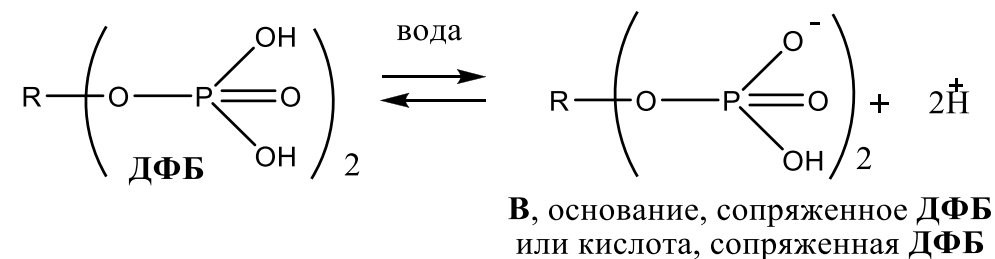


Схема 3.2 – Ионизация 3,28-дифосфата бетулина **ДФБ** в водно-спиртовом растворе; **R** – тритерпеновый радикал **ДФБ**

Амфотерный ион **В** можно рассматривать и как кислоту, и как основание, сопряженное этой кислоте. В воде этот ион может отдавать протон, выполняя функцию кислоты, или присоединить протон, выполняя функцию основания.

Сравнение УФ-спектров растворов **ДФБ** в 95% этаноле, водно-спиртовой смеси (1:1), этанольном растворе в присутствии H_2SO_4 или $4 \cdot 10^{-3}\text{M}$ водном растворе NaOH позволяет наглядно проиллюстрировать кислотно-основные свойства **ДФБ** (рисунок 3.12, таблица 3.4).

Спектры $9,8 \cdot 10^{-4}\text{M}$ растворов **ДФБ** в $4 \cdot 10^{-3}\text{M}$ водном растворе NaOH и в 95% этаноле практически совпадают, тогда как интенсивность поглощения λ полосы ($n \rightarrow p^*$ переходы) при $\lambda_{\text{max}} = 256 \text{ нм}$ в спектре **ДФБ** в $0,02\text{M}$ этанольном растворе

H_2SO_4 возрастает практически вдвое (рисунок 3.11). Аналогичное увеличение A наблюдается в УФ-спектре ДФБ в среде этанол-вода 1:1 (таблица 3.4).

Эти данные свидетельствуют о том, что в 95% этаноле, как и в водном растворе NaOH , ДФБ преимущественно представлен основанием **B**, а в этанольном растворе H_2SO_4 , либо в водно-этанольной среде (1:1) доминирующей является неионизированная форма ДФБ. Коэффициент молярной экстинкции ϵ ДФБ почти в полтора раза выше, чем для его ионизованной формы (таблица 3.4).

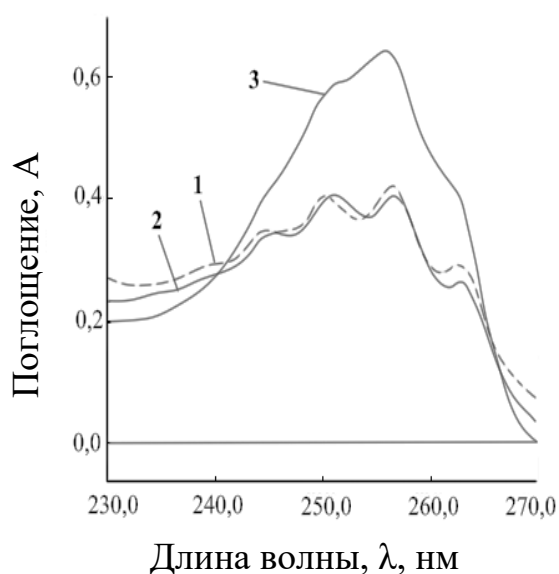


Рисунок 3.11 – УФ-спектры $1 \cdot 10^{-3}$ М растворов ДФБ: 1 – в 95% этаноле; 2 – в $4 \cdot 10^{-3}$ М водном растворе NaOH ; 3 – в 0,02 М этанольном растворе H_2SO_4

Для количественных расчетов изучались спектры растворов с постоянной ионной силой, создаваемой $1 \cdot 10^{-2}$ М LiClO_4 .

Таблица 3.4

Влияние природы среды на УФ-спектры ДФБ

Условия	$C, \cdot 10^4, \text{ M}$	A	$\epsilon, \text{ л/моль} \cdot \text{ см}$
95% этанол	9,8	0,430	439
95% этанол, LiClO_4	9,8	0,410	418
$4 \cdot 10^{-3}$ М водный раствор NaOH	9,8	0,410	418
95% этанол – вода (1:1)	4,9	0,294	588
95% этанол – вода (1:1), LiClO_4	4,9	0,373	761
0,02 М этанольный раствор H_2SO_4	9,8	0,650	663

Следовательно, используя УФ-спектральные характеристики в области 256 нм, можно однозначно охарактеризовать ионизованное состояние ДФБ в различных средах. Кажущийся коэффициент молярного поглощения зависит от электролита, создающего постоянную ионную силу, полярности среды, рН раствора и прочие.

3.2.2. Исследование комплексообразования ДФБ с трисамином

При добавлении водного раствора **Трис** в этанольный $9,8 \cdot 10^{-4} \text{M}$ раствор ДФБ с рН 2,5 равновесие на первой стадии сдвигается в сторону основания **В**, и следует ожидать снижение величины поглощения A . Данные рисунка 3.12 и таблицы 3.5 подтверждают снижение поглощения A при увеличении молярного отношения **Трис** и ДФБ $\alpha = \frac{n_{\text{Трис}}}{n_{\text{ДФБ}}}$,

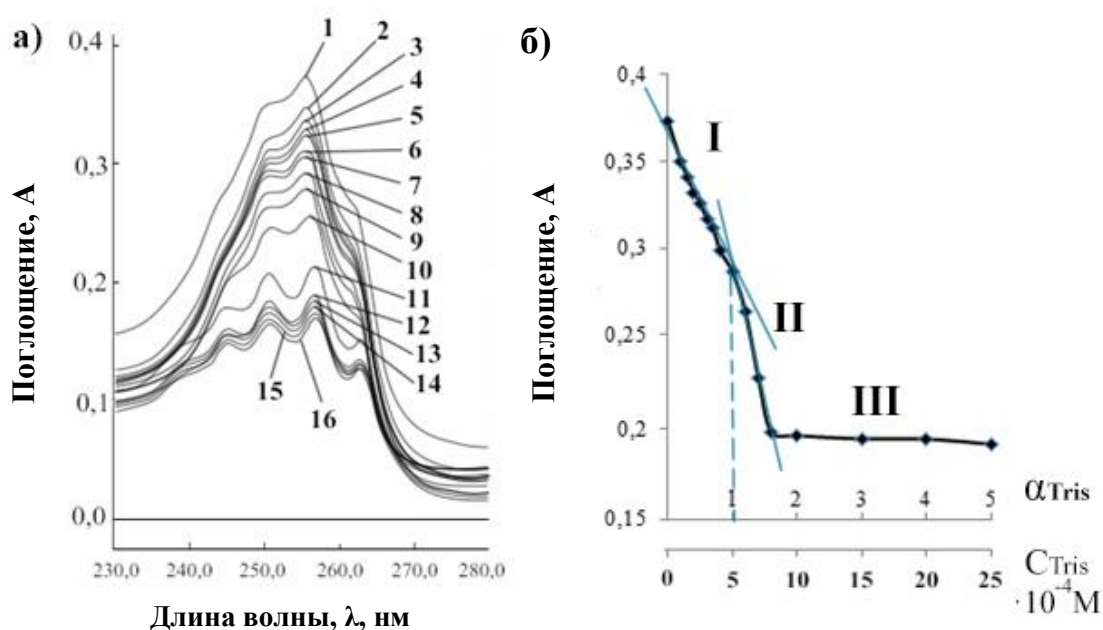


Рисунок 3.12 – Данные УФ-спектров смесей ДФБ и **Трис** при постоянной концентрации $C_{\text{ДФБ}} = 4,9 \cdot 10^{-4} \text{M}$, концентрация перхлората лития $1 \cdot 10^{-2} \text{M}$: а) $A = f(\lambda)$; б) зависимость поглощения A от молярного соотношения $A = f(\alpha)$, где $\alpha = \frac{n_{\text{Трис}}}{n_{\text{ДФБ}}}$, и от концентрации **Трис** в исследуемых растворах $A = f(C_{\text{Трис}})$.

Данные УФ-спектров к рисунку 3.13

№ кривой	$\alpha = \frac{p_{\text{Трис}}}{p_{\text{ДФБ}}}$	$C_{\text{Трис}}, \cdot 10^4 \text{М}$	$\lambda, \text{нм}$	A	№ кривой	$\alpha = \frac{p_{\text{Трис}}}{p_{\text{ДФБ}}}$	$C_{\text{Трис}}, \cdot 10^4 \text{М}$	$\lambda, \text{нм}$	A
1	0	0	255,6	0,373	9	1,0	5	259,1	0,286
2	0,2	1,0	255,7	0,35	10	1,2	6	259,2	0,263
3	0,3	1,5	255,9	0,341	11	1,4	7	259,5	0,225
4	0,4	2,0	256,0	0,332	12	1,6	8	260,0	0,194
5	0,5	2,5	256,6	0,326	13	2,0	10	260,0	0,192
6	0,6	3,0	256,9	0,317	14	3,0	15	260,0	0,190
7	0,7	3,5	257,4	0,312	15	4,0	20	260,0	0,190
8	0,8	4,0	258,9	0,299	16	5,0	25	260,0	0,187

Для установления стехиометрии солевого комплекса **Трис** и **ДФБ** нами проведено спектрофотометрическое титрование в соответствии с методом непрерывных изменений – методом Остромысленского-Жоба (рисунок 3.13).

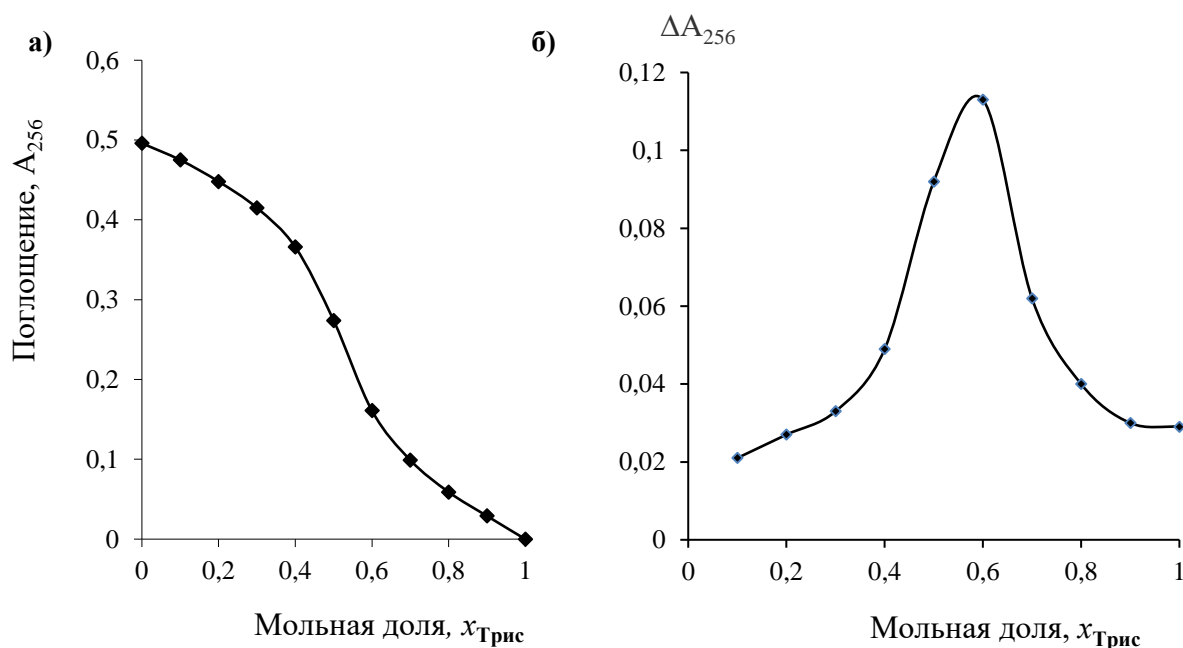


Рисунок 3.13 – Спектрофотометрическое титрование в соответствии с методом непрерывных изменений. Концентрации исходных растворов **ДФБ** и **Трис** равны $9,8 \cdot 10^{-4} \text{М}$, концентрация перхлората лития $1 \cdot 10^{-2} \text{М}$, среда этанол-вода:

а) $A = f(x_{\text{Трис}})$; б) $\Delta A = f(x_{\text{Трис}})$.

Зависимость $\Delta A = f(x_{\text{Трис}})$ показывает, что стехиометрия комплекса **ДФБ** и **Трис** (рисунок 3.13) равна 1:1, что соответствует отношению где $\alpha = \frac{n_{\text{Трис}}}{n_{\text{ДФБ}}}$, равного 1, на первом участке зависимости $A = f(\alpha)$ (рисунок 3.13б). Насыщение **ДФБ** как кислоты трисамином в качестве основания (участок III) достигается при значениях α , близком к полутора (рисунок 3.12б).

Солевой характер комплекса подтвержден нами потенциометрическим титрованием спиртового раствора **ДФБ** водным раствором 0,5М **Трис** и сравнением результатов с титрованием **ДФБ** 0,2М водным раствором NaOH (рисунок 3.14). Кривая титрования **ДФБ** $\text{pH} = f(V)$ в обоих случаях имеет типичный вид кривых титрования кислоты основанием, однако в случае трисамина **ДФБ** титруется как одноосновная, а при титровании **ДФБ** раствором NaOH как двухосновная кислота.

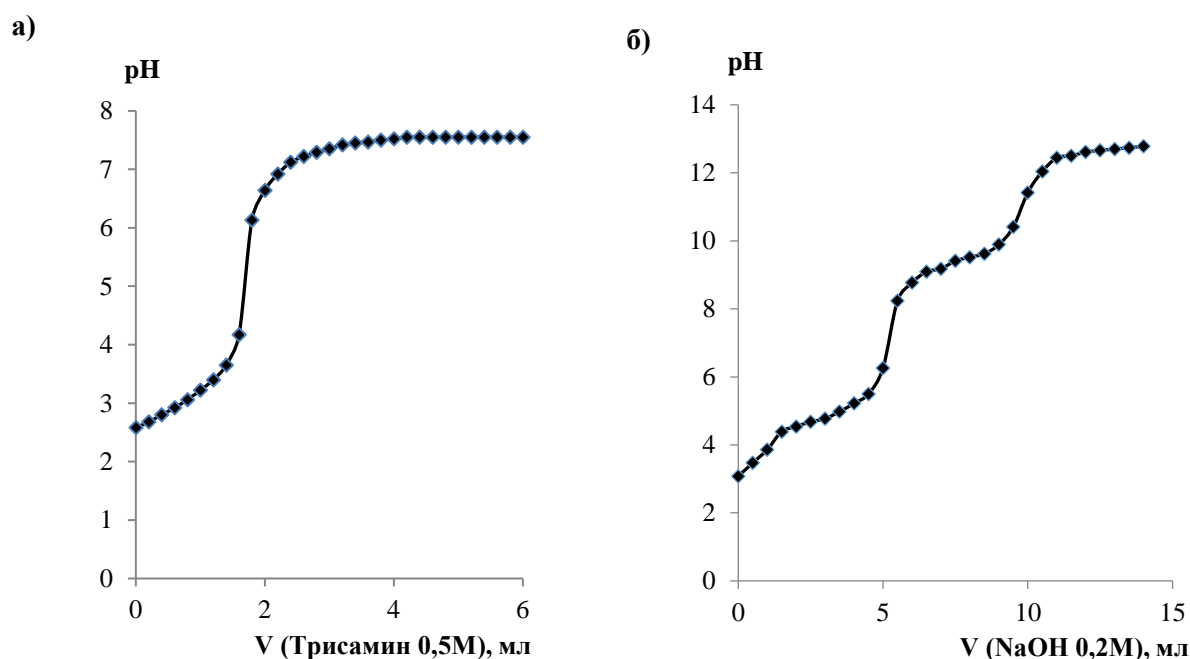


Рисунок 3.14 – Результаты потенциометрического титрования 10 мл 0,05М этанольного раствора 3,28-дифосфата бетулина водными растворами оснований: а) 0,5М трисамина; б) 0,2М NaOH.

Образование солевых комплексов **ДФБ** с трисамином в растворе также изучено с использованием ^{31}P -ЯМР-спектров (рисунок 3.15, таблица 3.6). Сигнал

фосфора при С-3 в ДФБ смещался с $-0,58$ м.д. до $+1,10$ м.д., а фосфора при С-28 – с $+0,28$ м.д. до $+2,08$ м.д.. При избытке Трис наибольшие изменения наблюдались для фосфора при С-28 ДФБ: $\delta = 3,71$ м.д.

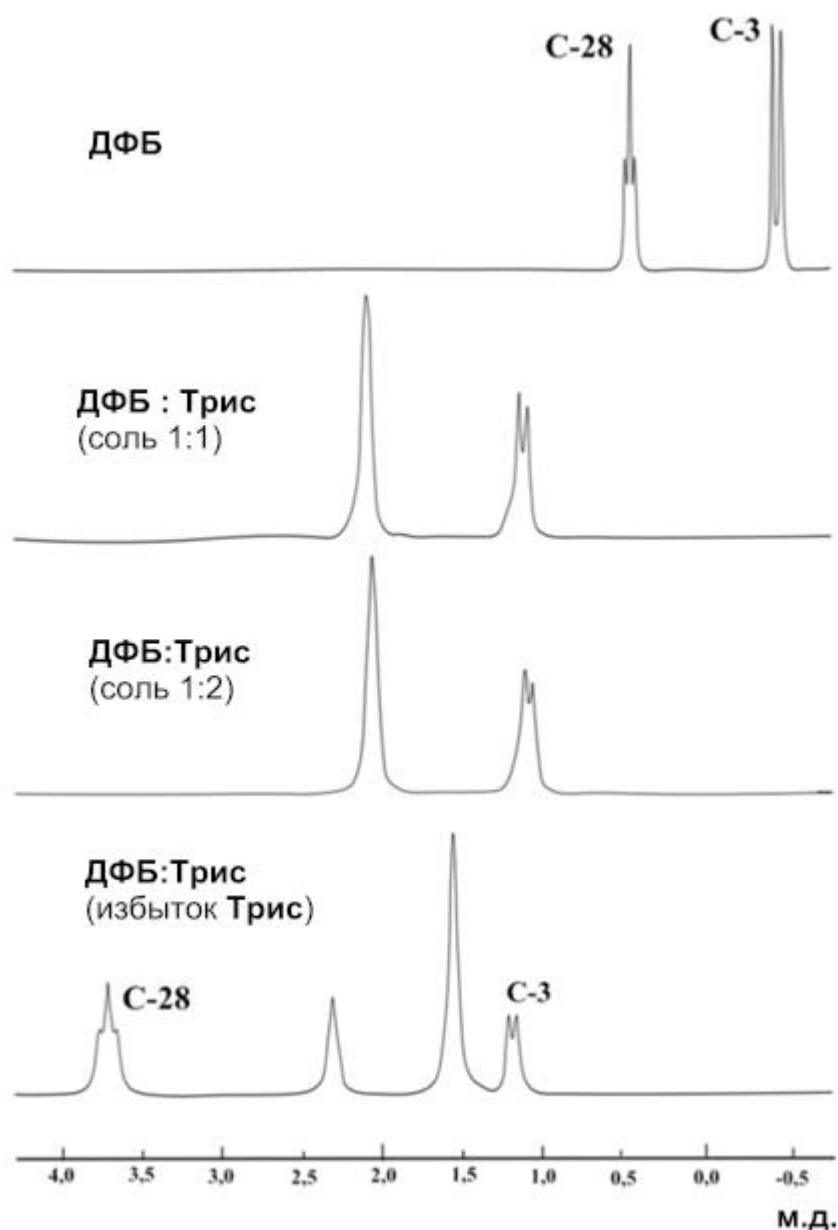


Рисунок 3.15 – ^{31}P -ЯМР спектры ДФБ и его комплексов с трисамином (DMSO-d_6 , стандарт Ph_3P , $\delta = 5,97 \pm 0,03$ м.д.)

Следует отметить, что во всех случаях более сильные изменения в спектре происходили у фосфора при С-28 ДФБ.

Данные ^{31}P -ЯМР спектров ДФБ и его комплексов с аминами

δ , м.д.	ДФБ	ДФБ : Трис (1:1)	ДФБ : Трис (1:2)	ДФБ : Трис (изб. Трис)
С-28, д (J, Гц)	-0,58 (8,15)	1,10 (8,45)	1,07 (8,12)	1,18 (8,10)
С-3, т	0,28	2,08	2,06	3,71

Данные Фурье-ИК-спектров подтвердили образование комплексов ДФБ-Трис (рисунок 3.16).

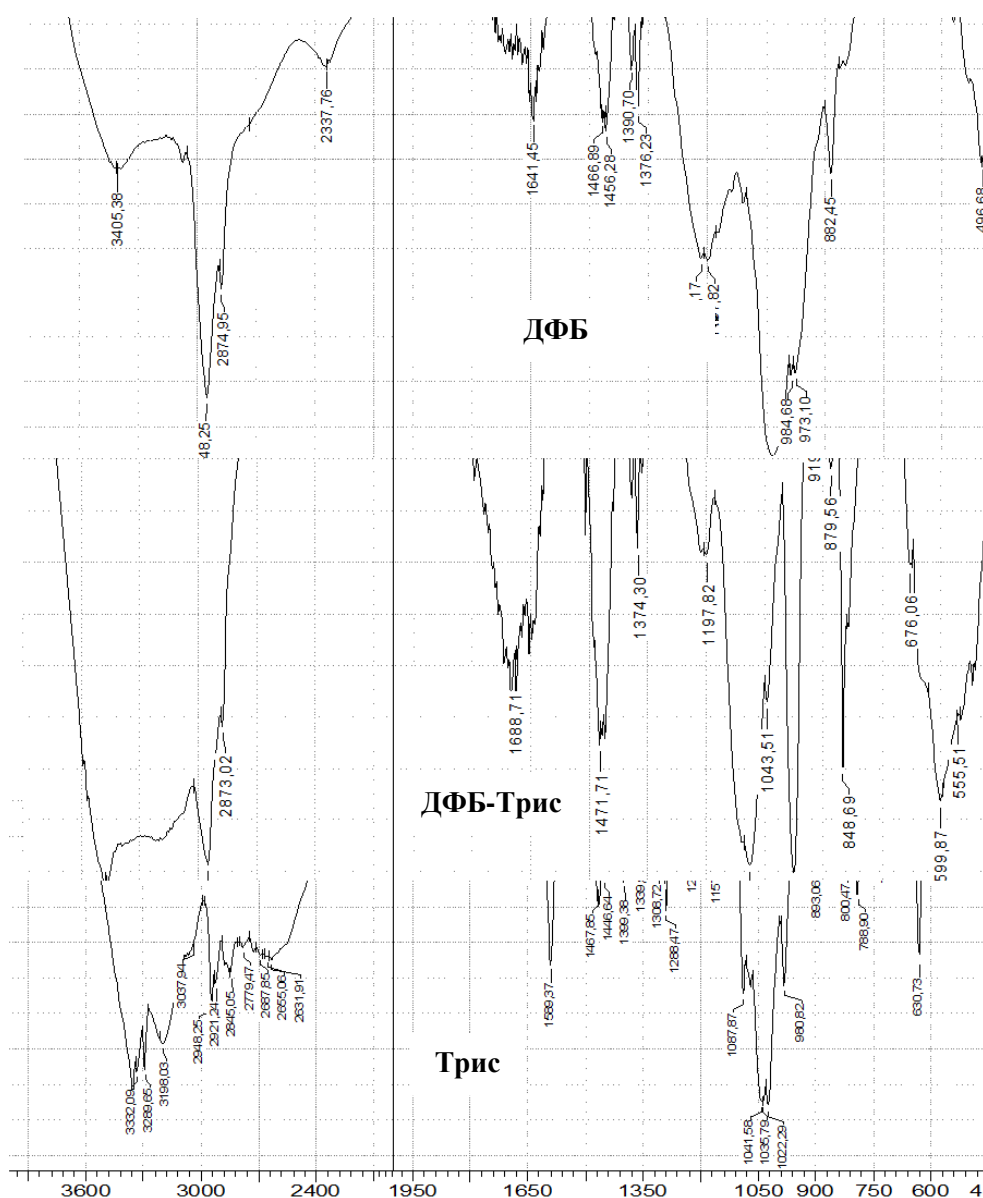


Рисунок 3.16 – Фурье-ИК-спектры ДФБ (верхний), комплекса ДФБ-Трис (средний) и Трис (нижний)

Форма и расположение полос валентных колебаний спиртовых С-О групп (ν 1041-1022 см^{-1}) и эфирных С-О групп (ν 1031-973 см^{-1}) в ДФБ изменялись, становясь широкой полосой в области 1070-970 см^{-1} . Значительно изменялись полосы валентных колебаний связей Р-О (ν 497 см^{-1}) и Р=О (ν 1641 см^{-1} , δ 1215 см^{-1}) в ДФБ. Индекс гидрофильности $I = T_{497-500}/T_{2948}$, равный отношению пропускания при 497 см^{-1} к пропусканию при 2948 см^{-1} (СН, СН₂, СН₃ тритерпенового скелета), изменялся от 3,0 для исходного ДФБ до 1,5-1,7 для солевого комплекса ДФБ с трисамином.

Данные ³¹Р-ЯМР и ИК спектров позволяют предположить, что взаимодействие ДФБ с трисамином обусловлено не только электростатическими взаимодействиями, приводящими к солевой природе комплекса (данные потенциометрического спектрофотометрического титрования), но и неспецифическими нековалентными взаимодействиями, аналогично взаимодействию фосфатов типа фитиновой кислоты с аминами [117].

Следовательно, взаимодействие ДФБ и Трис можно рассматривать как образование солевого комплекса, обусловленного различными межмолекулярными связями.

При установленной стехиометрии взаимодействия Трис и ДФБ 1:1 это взаимодействие можно рассматривать следующим образом:



Константа устойчивости солевого комплекса будет выражаться как:

$$K_{\text{уст}} = \frac{[\text{Трис} \cdot \text{ДФБ}]}{[\text{Трис}][\text{ДФБ}]} \quad (3.2),$$

где в квадратных скобках указаны равновесные молярные концентрации компонентов и комплекса.

При использовании значений текущей концентрации вместо активности кажущаяся константа устойчивости $K'_{\text{уст}}$ комплекса будет выражаться:

$$K'_{\text{уст}} = \frac{C_{\text{комплекса}}}{(C_{\text{ДФБ}}^{\circ} - C_{\text{комплекса}}) \cdot (C_{\text{Трис}}^{\circ} - C_{\text{комплекса}})} \quad (3.3)$$

При существенном постоянном избытке **ДФБ** в эксперименте по методу молярных соотношений концентрация комплекса будет намного меньше, чем концентрация **ДФБ**. В этих условиях для определения константы устойчивости можно использовать метод Бенеши-Гильдебранда и $K_{уст}$ представить в виде:

$$K'_{уст} = \frac{C_{\text{комплекса}}}{C^0_{\text{ДФБ}} \cdot (C^0_{\text{Трис}} - C_{\text{комплекса}})} \quad (3.4), \text{ где}$$

как следует из данных УФ-спектров $C_{\text{ДФБ}} = C^0_{\text{ДФБ}}$ (таблица 3.4).

Концентрацию комплекса можно определить, используя изменение поглощения A при $\lambda = 256$ нм и коэффициента экстинкции за счет образования солевого комплекса в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера.

$$C_{\text{комплекса}} = \Delta A / \varepsilon \cdot l \quad (3.5)$$

С учетом уравнений (3.4) и (3.5), уравнение Бенеши-Гильдебранда принимает вид:

$$\frac{C^0_{\text{ДФБ}} \cdot l}{\Delta A} = \frac{1}{\varepsilon'} + \frac{1}{K'_{уст} \cdot \varepsilon} \cdot \frac{1}{C^0_{\text{Трис}}} \quad (3.6), \text{ где:}$$

$\Delta A = A^0_{\text{ДФБ}} - A_{\text{текущее ДФБ}}$ (в интервале $\alpha = n_{\text{Трис}}/n_{\text{ДФБ}}$ от 0,1 до 1,0);

$C^0_{\text{ДФБ}}$ - исходная концентрация **ДФБ**, равная $4,9 \cdot 10^{-4}$ М;

l – толщина кюветы, равная 1 см.

Уравнение (3.6) решали графическим способом, используя зависимость $C^0_{\text{ДФБ}}/A$ от $1/C^0_{\text{Трис}}$ (рисунок 3.17).

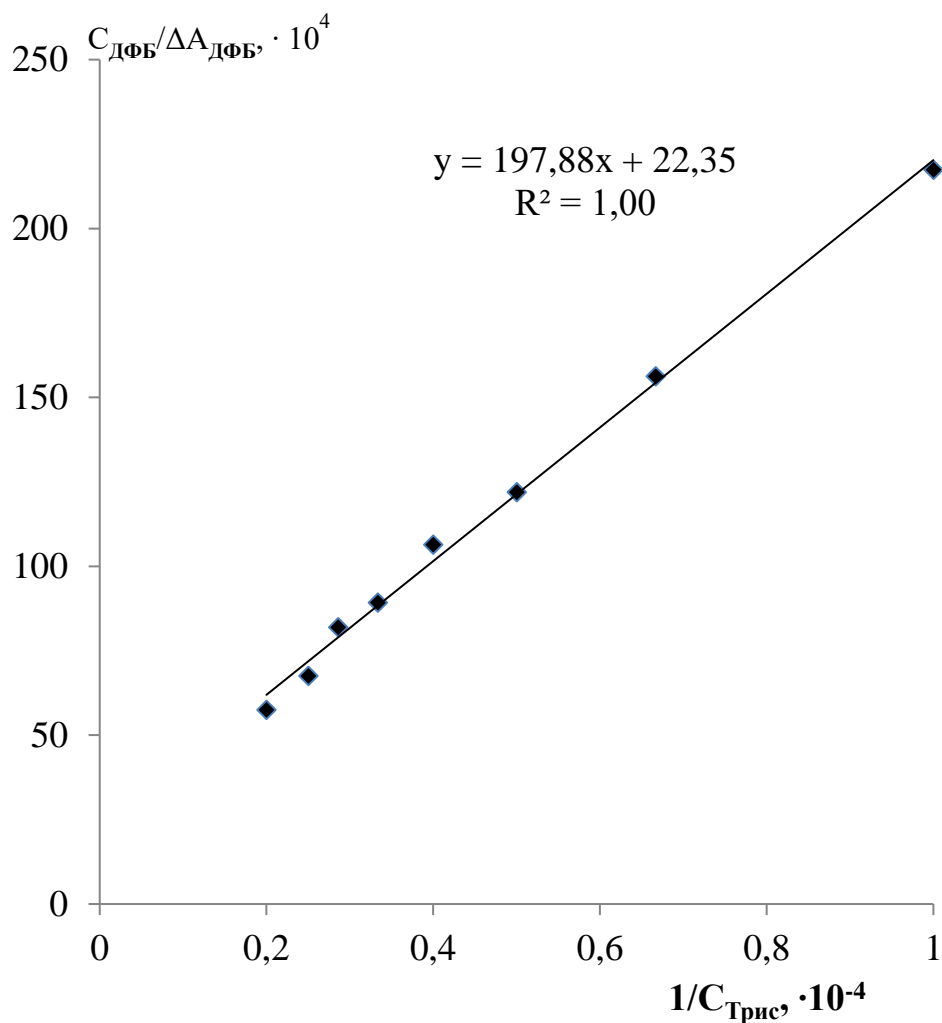


Рисунок 3.17 – Графическое решение уравнения (6)

Кажущаяся константа устойчивости $K'_{уст}$ солевого комплекса была равна 1130 ± 55 л/моль. Эффективный показатель молярного поглощения солевого комплекса ε' в соответствии с уравнением (3.6) был равен 422 л/моль·см, которая, вероятно, соответствует разности коэффициентов молярного поглощения исходного **ДФБ** и солевого комплекса. Поскольку молярный коэффициент исходного **ДФБ** равен 746 л/моль·см, то, вероятно, молярный коэффициент поглощения комплекса равен 324 л/моль·см. Эта величина близка по своему значению к рассчитанной по зависимости $A = f(\alpha)$ в области плато, где $A = 0,190$ (рисунок 3.12): ε равен 380 л/моль·см при концентрации исходного **ДФБ** $5 \cdot 10^{-4}$ М. Комплекс **ДФБ** с **Трис** со стехиометрией 1:1 был смоделирован в программе HyperChem 8.0 с использованием семиэмпирического метода AM1 (рисунок 3.18).

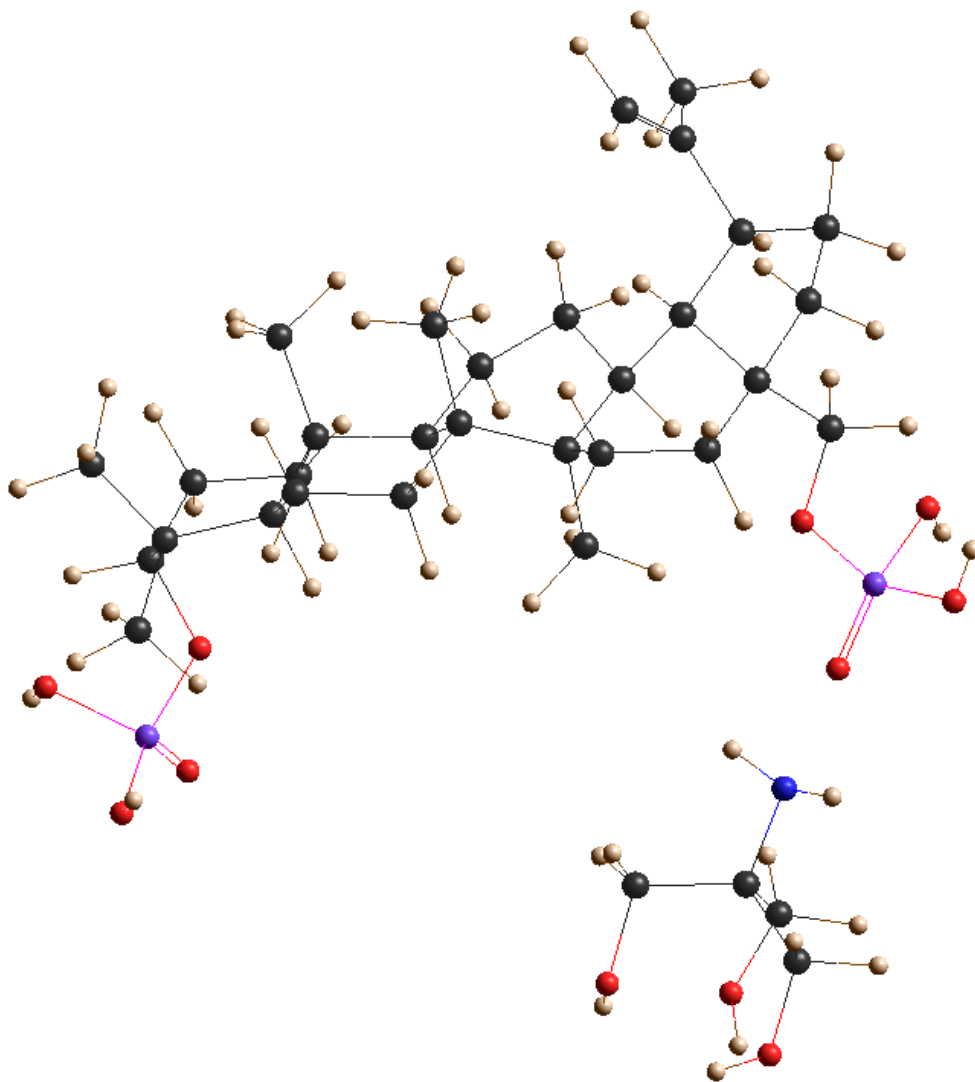


Рисунок 3.18 – Схематическое представление комплекса ДФБ и Трис со стехиометрией 1:1 в программе HyperChem 8.0 (семиэмпирический метод AM1) [103].

Таким образом, УФ-спектральным методом с использованием подходов Остромысленского-Жоба и метода молярных отношений установлено образование солевого комплекса ДФБ с Трис состава 1:1. Кажущаяся константа устойчивости комплекса ДФБ с Трис равна 1130 л/моль.

3.2.3. Свойства солевых комплексов ДФБ с ксимедоном

Влияние природы амина на характер кислотно-основного взаимодействия с ДФБ было изучено УФ-спектральным методом. Ксимедон имеет интенсивное поглощение карбонильного хромофора ($n - \pi^*$ и $\pi - \pi^*$ переходы) в области 299 нм. Интенсивное поглощение в области 270-310 нм в спектрах реакционной смеси с ксимедоном не позволяет оценить изменения ДФБ, поглощающего в области 240-270 нм. В отличие от этого, аминоспирт меглумин не проявляется в этой области УФ-спектра, что позволяет оценивать кислотно-основное взаимодействие по изменению полосы фосфатной группы ДФБ.

Участие ксимедона в реакции переноса протона с ДФБ подтверждено изменением поглощения карбонильного хромофора в ксимедоне и его протонированной форме (рисунок 3.19, таблица 3.7). Концентрация ксимедона соответствовала условиям потенциометрического титрования, а постоянную ионную силу в системе обеспечивали $5,9 \cdot 10^{-4}$ М раствором перхлората лития. В УФ-спектрах ксимедона в реакционной смеси отмечался батохромный сдвиг с 299,1 нм до 304,2 нм и гиперхромный эффект, проявляющийся в увеличении коэффициента молярного поглощения ϵ от 8508 до 10441 л/моль·см. Батохромный эффект и гиперхромный сдвиг в спектрах, вероятно, характеризуют появление в реакционной смеси протонированной формы ксимедона (рисунок 3.19, таблица 3.7).

Полностью протонированную форму ксимедона характеризовали, используя соль – ксимедона гидрохлорид, синтезированную из этанолмочевины и ацетилацетона в присутствии соляной кислоты [118].

Таблица 3.7

Данные УФ-спектров $5,9 \cdot 10^{-5} \text{M}$ растворов ксимедона в присутствии ДФБ и в ацетатно-фосфатно-боратном буферном растворе

№	Условия		УФ-спектральные характеристики		
	$\alpha = n_{\text{ДФБ}}/n_{\text{амин}}$	pH	λ , нм	A	ϵ' , л/моль·см
1	0	5,76	299,1	0,502	8508
2	0,5	4,75	299,8	0,505	8559
3	1,0	4,10	300,7	0,516	8746
4	1,5	4,02	301,6	0,539	9136
5	2,0	3,96	302,5	0,549	9305
6	2,5	3,92	302,9	0,558	9458
7	3,0	3,88	303,5	0,575	9746
8	3,5	3,82	303,6	0,578	9797
9	4,0	3,79	303,9	0,583	9881
10	4,5	3,75	304,1	0,605	10254
11	5,0	3,72	304,2	0,616	10441
	Буферный раствор	pH	λ , нм	A	ϵ' , л/моль·см
		12,86	299,7	0,4666	7908
		11,86	299,7	0,4578	7759
		11,24	299,8	0,4575	7754
		10,67	299,8	0,4563	7733
		6,00	299,9	0,4534	7685
1'		3,99	302,8	0,4524	7667
2'		3,72	305,3	0,5125	8686
3'		3,40	307,0	0,5541	9391
4'		3,22	307,6	0,5769	9777
5'		2,92	308,1	0,6003	10173
6'		2,62	308,5	0,6111	10357
7'		2,31	308,7	0,6177	10469
8'	1,33	308,8	0,6365	10788	
9'	Фитиновая кислота (ФК:Кси = 1:6 по молям)	-	308,7	0,6370	10575

Кажущийся коэффициент молярной экстинкции ϵ ксимедона гидрохлорида, равный $10788 \text{ л/моль}\cdot\text{см}$, и наблюдаемая полоса поглощения при λ_{max} , равной 309 нм , практически совпадали со спектральными характеристиками ксимедона при этой же концентрации в $0,1\text{М}$ растворе соляной кислоты, а также в растворе фитиновой кислоты при молярном соотношении фитиновая кислота : ксимедон = $1:6$ (рисунок 3.19, таблица 3.7).

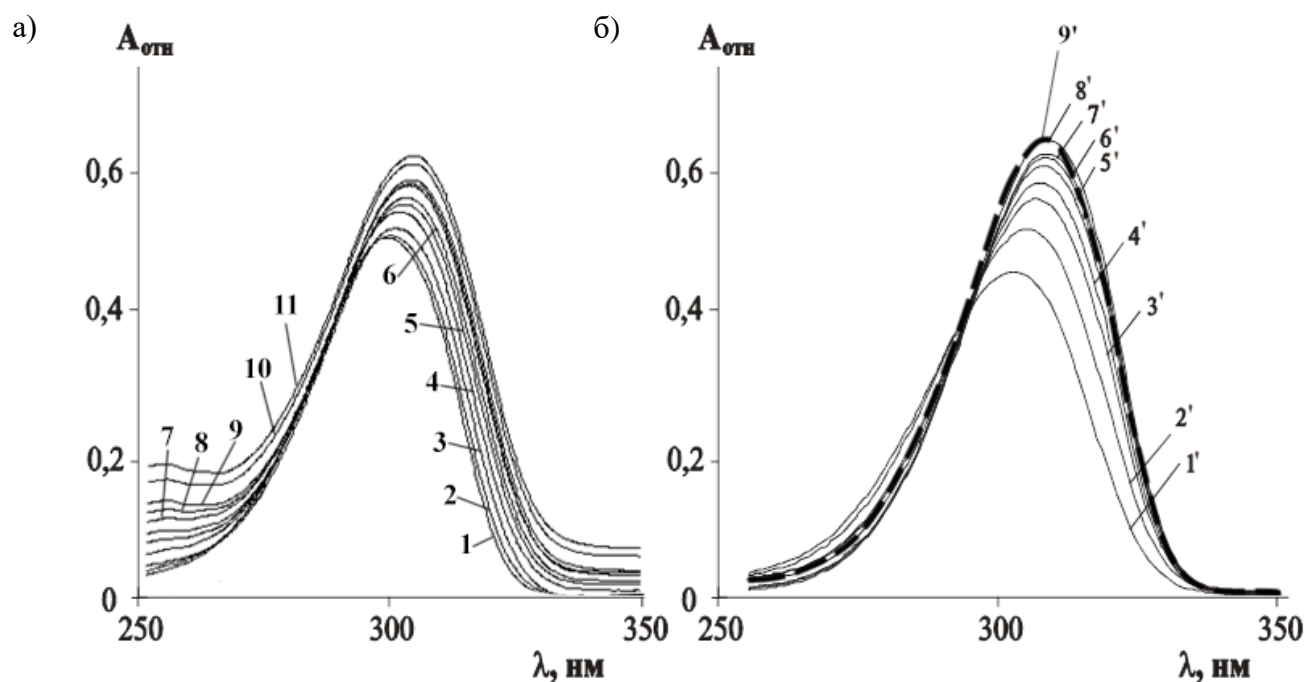


Рисунок 3.19 – УФ-спектры поглощения $5,9 \cdot 10^{-5}\text{М}$ водного раствора ксимедона и его протонированной формы, полученной: а) в смеси с ДФБ; $C_{\text{LiClO}_4} = 5,9 \cdot 10^{-4} \text{ М}$; б) в ацетатно-фосфатно-боратном буферном растворе и в фитиновой кислоте (жирная пунктирная линия)

Квантово-химическими расчетами было установлено, что в нейтральной среде максимальный отрицательный заряд располагается на карбонильном атоме углерода ($-0,470$), тогда как на азоте отрицательный заряд составляет $-0,359$ (рисунок 3.20). Следовательно, согласно схемы 3.3, взаимодействие протона в кислой среде на первой стадии может происходить как по основному азоту, так и по кето-группе ксимедона. Ранее установленная по УФ-спектральным данным величина $pK_a = 3,25$ [119] характеризует ксимедон как слабое основание.

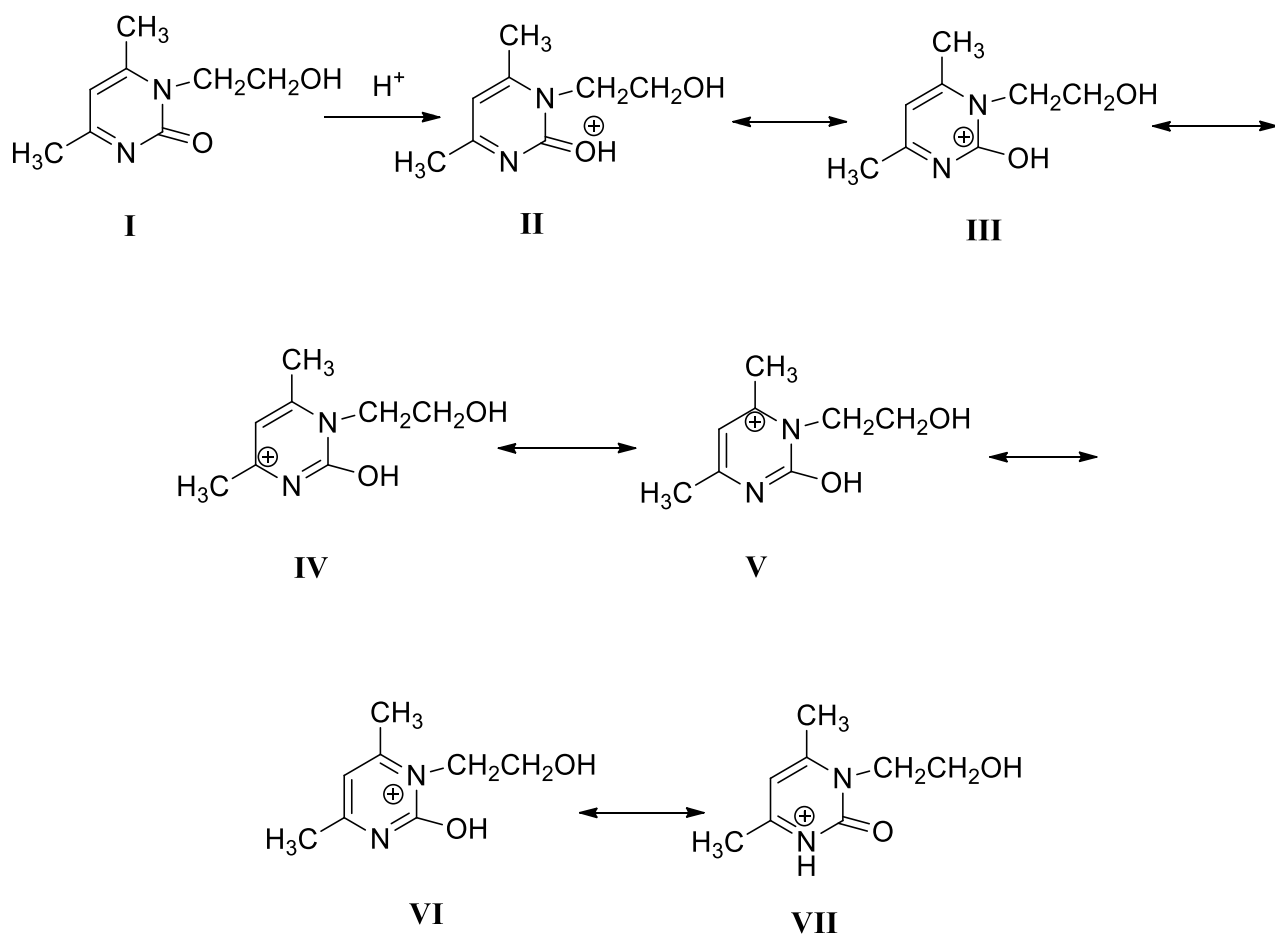
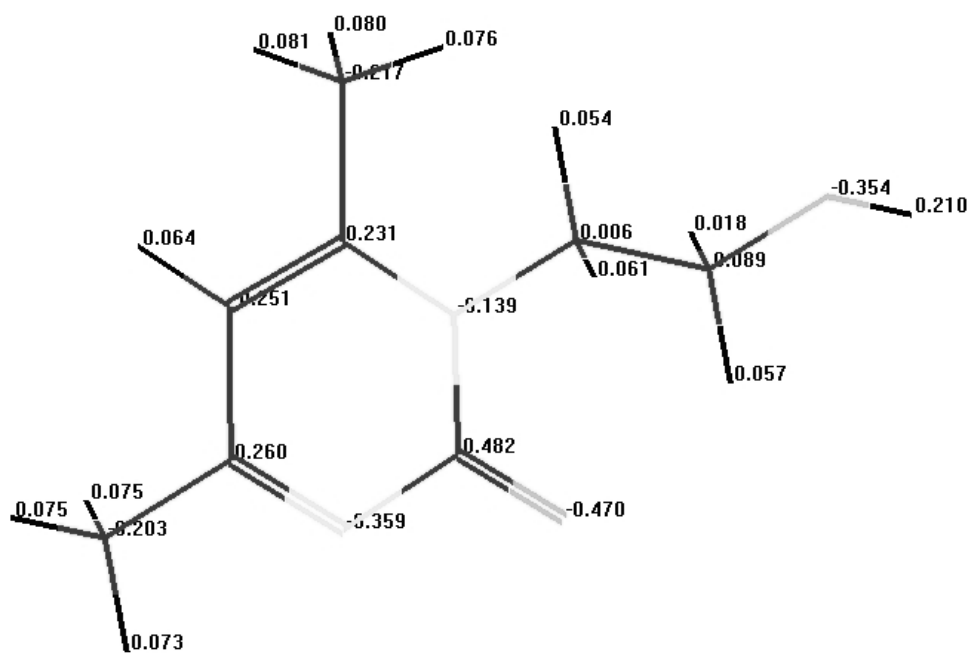
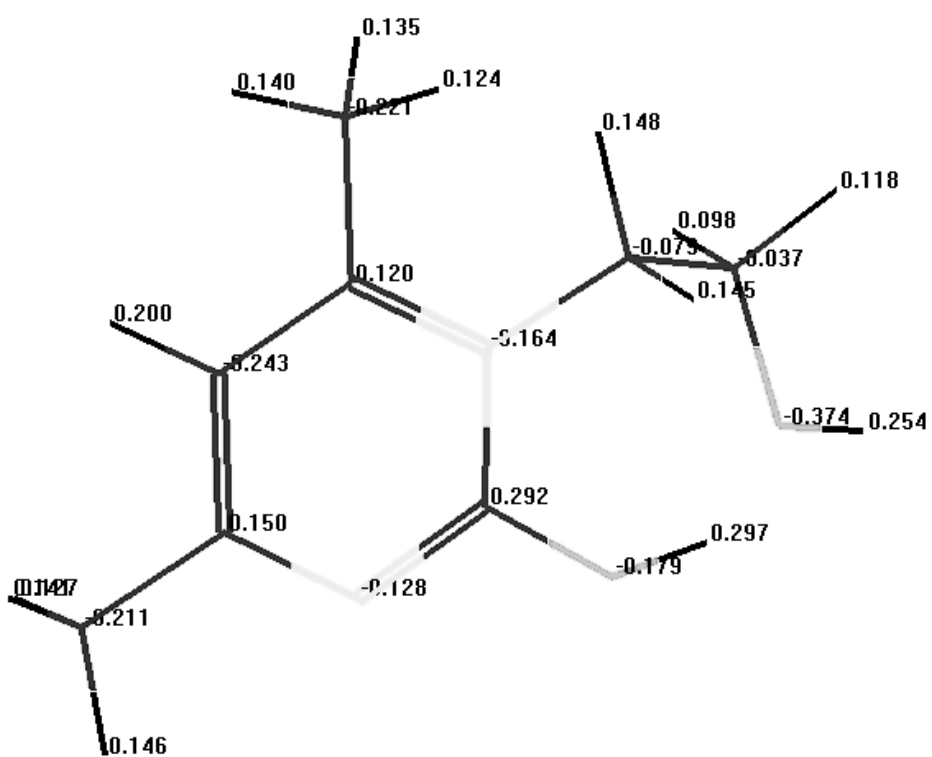


Схема 3.3 – Возможные структуры протонированного ксимедона.



a)



б)

Рисунок 3.20 – Квантово-химический расчет распределения зарядов в молекуле ксимедона (I) (а) и его протонированной формы (VI) (б).

Различие в батохромных сдвигах ксимедона в его реакционной смеси с ДФБ ($\lambda_{\max} = 304$ нм) и ксимедона гидрохлорида ($\lambda_{\max} = 309$ нм), а также ксимедона в растворах соляной и фитиновой кислот при близких значениях коэффициента молярной экстинкции (10788 л/моль·см), вероятно, можно отнести за счет образования комплексов ксимедона с ДФБ, в которых ксимедон не полностью протонирован, в отличие от продуктов взаимодействия ксимедона с сильными кислотами, образующих соли.

Это предположение может быть проиллюстрировано зависимостями рН от коэффициента молярной экстинкции $\text{pH} = f(\epsilon)$ и коэффициента молярной экстинкции от молярного соотношения ДФБ и амина $\epsilon = f(\alpha)$ (рисунок 3.21 а,б). Подтверждением реакции с переносом протона при взаимодействии ксимедона с ДФБ являются существенное увеличение коэффициента молярной экстинкции при рН меньше 4, тогда как в области рН от 4 до 6 он остается постоянным, а также практически линейная симбатная зависимость коэффициента молярной экстинкции ϵ от молярной доли ДФБ (α).

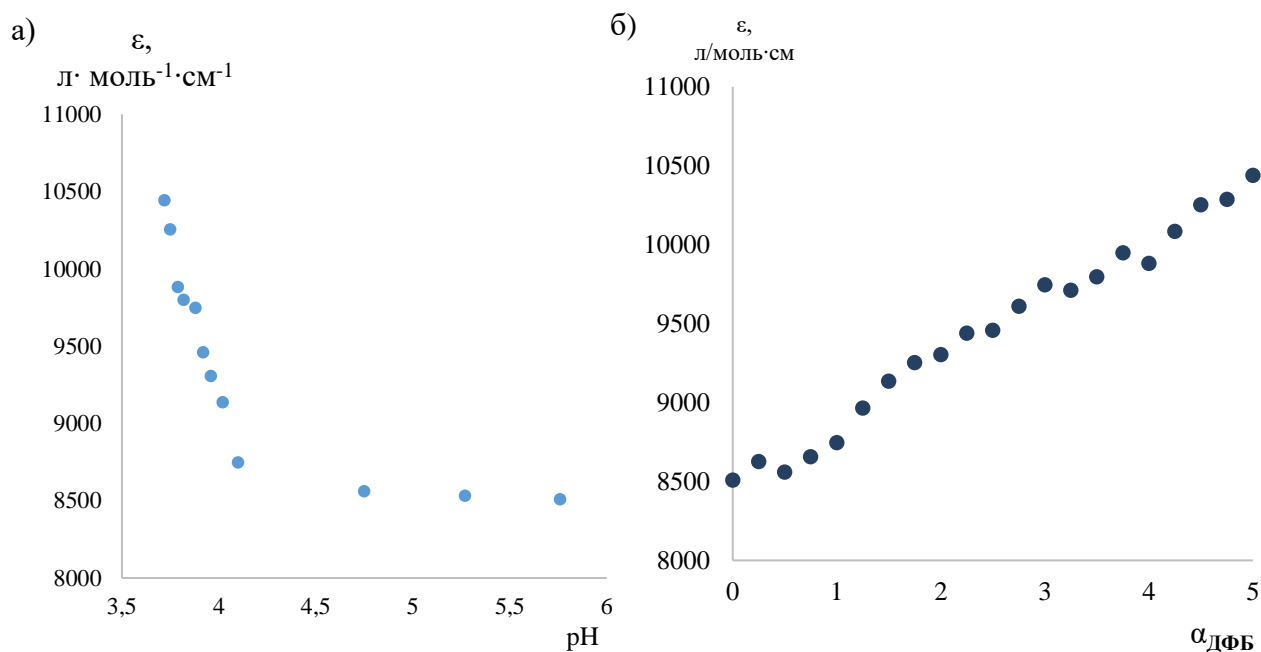


Рисунок 3.21 – а) Зависимость коэффициента молярной экстинкции ϵ от рН раствора, $\epsilon = f(\text{pH})$; б) Зависимость коэффициента экстинкции ϵ от $\alpha_{\text{ДФБ}}$, $\epsilon = f(\alpha_{\text{ДФБ}})$

Полученные результаты позволяют провести приближенную оценку величины pK_a ксимедона в его реакции с ДФБ, используя коэффициенты молярной экстинкции.

Отношение концентрации ксимедона как основания В к его концентрации его протонированной формы BH^+ определяется коэффициентами молярной экстинкции его протонированной и непротонированной форм в виде [120]:

$$\frac{C_B}{C_{BH^+}} = \frac{\varepsilon - \varepsilon_{BH^+}}{\varepsilon_B - \varepsilon} \quad (3.7),$$

где $\varepsilon = D/C \cdot l$ – кажущийся показатель поглощения.

Учитывая вышеизложенное, уравнение Гандерсона-Гассельбаха (3.8) можно представить в виде уравнения (3.9).

$$pK_a = pH - \lg \frac{[B]}{[BH^+]} \quad (3.8)$$

$$pK_a = pH - \lg \frac{\varepsilon - \varepsilon_{BH^+}}{\varepsilon_B - \varepsilon} \quad (3.9)$$

Для приближенной оценки pK_a использовали коэффициент молярной экстинкции ксимедона в щелочной среде ε_B при длине волны 299 нм, а коэффициент молярной экстинкции сопряженной кислоты ε_{BH^+} в растворе 0,1М соляной кислоты при длине волны 308 нм. Рассчитанная по уравнению (3.9) величина $pK_a(K_{сиH^+})=4,07 \pm 0,07$ для реакции переноса протона в ксимедоне при взаимодействии с ДФБ отличается от ранее установленной по буферным растворам с постоянной ионной силой $pK_a = 3,25$. Найденная величина $pK_a = 4,07$ не является термодинамической константой кислотности ксимедона и косвенно характеризует вклад других видов межмолекулярных взаимодействий в реакцию переноса протона с ДФБ.

Образование солевых комплексов ДФБ с ксимедоном было изучено с использованием ^{31}P -ЯМР-спектроскопии (рисунок 3.22).

Сигнал фосфора при С-3 в ДФБ изменялся в комплексе с ксимедоном с -0,58 м.д. (дублет без развязки от протонов) до +3,11 м.д., а сигнал фосфора при С-28 – с +0,28 м.д. до +4,44 м.д.

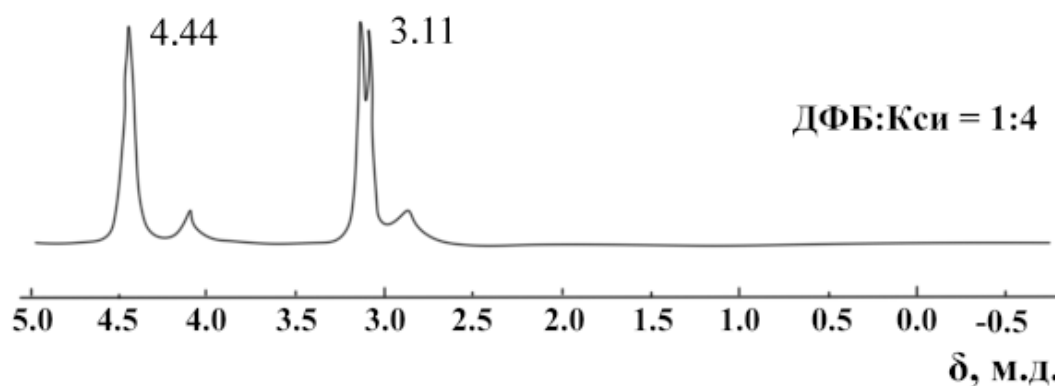


Рисунок 3.22 – Спектр ^{31}P -ЯМР комплекса ДФБ-Ксимедон 1:4 в D_2O , стандарт – H_3PO_4

Таким образом, полученные результаты характеризуют образование солевых комплексов с ксимедоном в растворе.

3.2.4. Свойства солевых комплексов ДФБ с меглумином

Потенциометрическое титрование водных $5,9 \cdot 10^{-5} \text{M}$ растворов аминов – ксимедона и меглумина, раствором $2,9 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ДФБ в этаноле показало снижение pH от исходных значений. Кривые зависимостей $\text{pH} = f(\alpha_{\text{ДФБ}})$, где $\alpha = n_{\text{ДФБ}}/n_{\text{амин}}$, выходят на плато в области pH 3,75 при соотношении ДФБ : амин, равном 4:1, что характеризует ДФБ как слабую кислоту в этих условиях (рисунок 3.23).

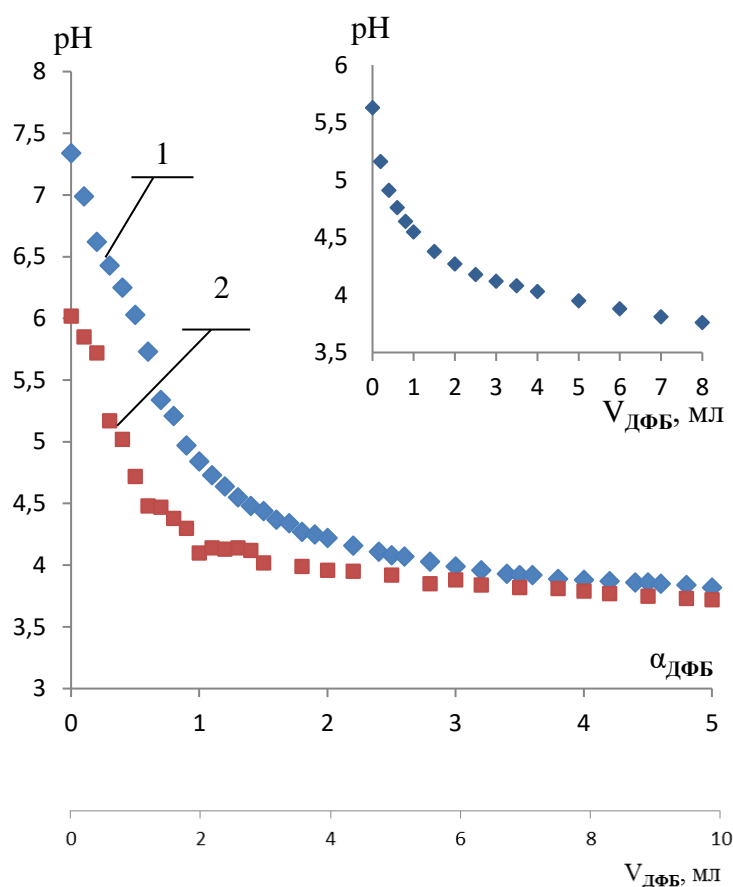


Рисунок 3.23 – Зависимость $\text{pH} = f(\alpha_{\text{ДФБ}})$, где $\alpha = n_{\text{ДФБ}}/n_{\text{амин}}$. Результаты потенциометрического титрования раствором $2,9 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ДФБ в этаноле водного $5,9 \cdot 10^{-5} \text{M}$ раствора амина: кривая 1 – меглумин; кривая 2 – ксимедон. На врезке показана зависимость $\text{pH} = f(V_{\text{ДФБ}})$ в холостом опыте при добавлении $2,9 \cdot 10^{-3} \text{M}$ этанольного раствора ДФБ в воду. Первоначальный общий объем титруемого раствора 100 мл.

Равновесное значение рН 3,75 соответствовало значению рН водного раствора **ДФБ** при этой же концентрации (рисунок 3.23, врезка) и не зависело от природы амина: ксимедона (слабого основания) или меглумина (основания средней силы с pK_a 9,52).

Спектры **ДФБ** характеризуются полосой фосфатной группы ($n \rightarrow p^*$ переходы) при $\lambda_{max} = 256$ нм с невысокими значениями кажущегося коэффициента молярной экстинкции ϵ , зависящими от ионизации фосфатных групп. Как правило, ионизованные анионные формы соединений, например, карбоксилаты, имеют меньший коэффициент молярного поглощения, чем карбоновые кислоты, в отличие от ионизованных катионных форм, например, протонированных аминов (как в случае с ксимедоном).

В водной среде амфотерный ион **В**, образующийся при ионизации **ДФБ** (схема 3.2), можно рассматривать и как кислоту, и как основание, сопряженное этой кислоте. Спектры растворов **ДФБ** в водном растворе NaOH и в 95% этаноле практически совпадают, тогда как интенсивность поглощения A в спектре **ДФБ** в этанольном растворе H_2SO_4 возрастает практически вдвое (рисунок 3.24). Эти данные свидетельствуют о том, что в 95% этаноле как и в водном растворе NaOH **ДФБ** преимущественно представлен основанием **В**, а в этанольном растворе H_2SO_4 доминирующей является неионизированная форма **ДФБ**. Коэффициент молярной экстинкции ϵ **ДФБ** в неионизированной форме почти в полтора раза выше, чем для его ионизованной формы. Реакцию **ДФБ** и меглумина изучали в растворах с постоянной ионной силой, создаваемой $1 \cdot 10^{-2} M LiClO_4$.

При добавлении водного раствора меглумина, содержащего $LiClO_4$, в этанольный раствор **ДФБ**, равновесие сдвигается в сторону амфотерной ионизованной формы – основания **В**, и, соответственно, следует ожидать снижение величины A_{256} .

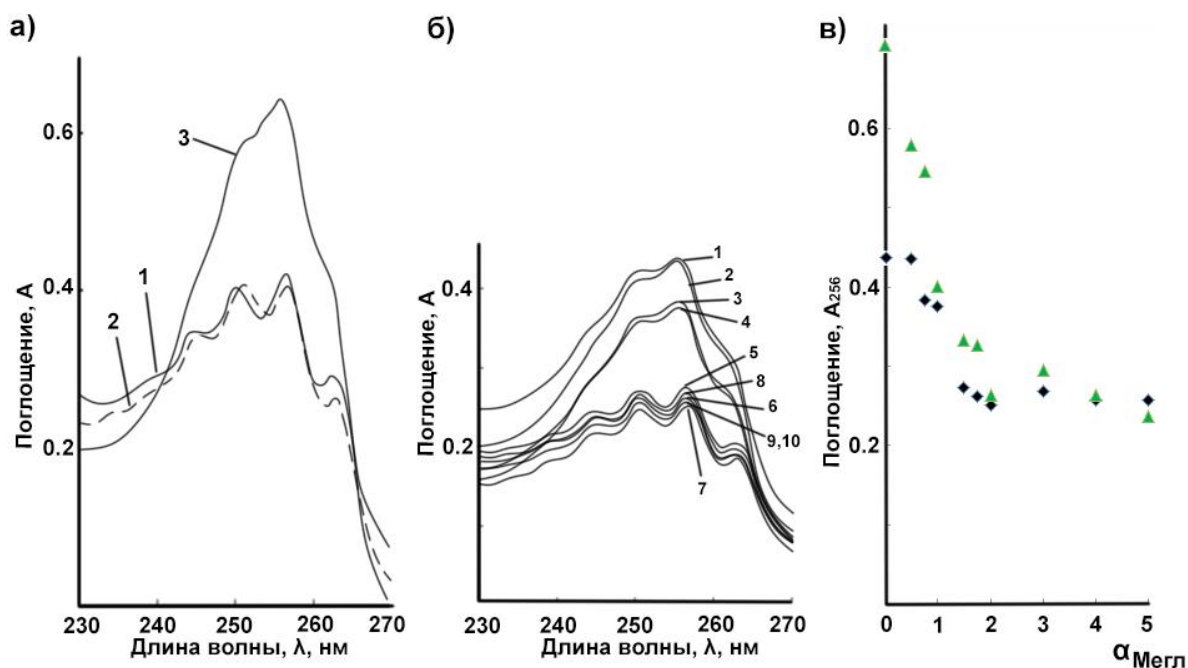


Рисунок 3.24 – УФ-спектры ДФБ в различных средах: а) в 95% этаноле (1), в $4 \cdot 10^{-3}$ М водном растворе NaOH (2), в 0,02М этанольном растворе H_2SO_4 (3). $C_{ДФБ}=1.0 \cdot 10^{-3}$ М; б,в) в растворах с меглумином $C_{ДФБ}=5.0 \cdot 10^{-4}$ М, $C_{LiClO_4}=1 \cdot 10^{-2}$ М, б) $A = f(\lambda)$; в) зависимость поглощения A_{256} от молярного соотношения меглумина к ДФБ, $A = f(\alpha_{Мегл})$, $\alpha = n_{Мегл} / n_{ДФБ}$;

Данные рисунка 3.24 и таблицы 3.8 подтверждают снижение A_{256} при увеличении молярного отношения меглумина к ДФБ α , увеличивающего содержание ионизованного ДФБ. Особо стоит отметить изменение ионизации фосфатных групп ДФБ во времени как в присутствии меглумина, так и в его отсутствие. Интенсивность поглощения A_{256} водно-спиртового раствора ДФБ за 4 суток возрастала практически вдвое (рисунок 3.24в, треугольные маркеры) за счет диссоциации, при этом при двукратном избытке меглумина поглощение ДФБ в реакционных смесях не зависело от времени выдержки.

В целом, полученные результаты свидетельствуют об образовании соли ДФБ и меглумина в области $\alpha=2$ (выход на «плато» на кривой $A=f(\alpha)$, рисунок 3.23) и $\alpha=4$ (выход на «плато» на кривой $pH=f(\alpha)$, рисунок 3.23). Возможно, солеобразование носит характер образования солевого комплекса. Аналогичная природа взаимодействия ДФБ с аминами была продемонстрирована на примере

реакции образования солевого комплекса **ДФБ** с трисамином в разделе 3.2.2. Состав комплекса был доказан с использованием подходов Остромысленского-Жоба и рассчитана кажущаяся константа устойчивости, равная 1130 л/моль. О сходстве характера взаимодействия **ДФБ** с трисамином и с меглумином свидетельствуют близкие величины поглощения A в области насыщения («плато» на кривых $A=f(\alpha)$), равные 0,20-0,25.

Таблица 3.8

Данные УФ-спектров по рисунку 3.24а,б

№ кривой	$\alpha = n_{\text{Мегл}} / n_{\text{ДФБ}}$	$C_{\text{Мегл}}, \cdot 10^4 \text{M}$	A		$\epsilon, \text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$	
			A_0	$A, \tau = 4 \text{сут}$	ϵ_0	$\epsilon, \tau = 4 \text{сут}$
1	0	0	0,437	0,709	874	1418
2	0,5	2,5	0,435	0,580	870	1160
3	0,75	3,75	0,384	0,546	768	1092
4	1	5,0	0,376	0,401	752	802
5	1,5	7,5	0,273	0,333	546	666
6	1,75	8,75	0,262	0,327	524	654
7	2	10,0	0,251	0,263	502	526
8	3	15,0	0,268	0,295	536	590
9	4	20,0	0,258	0,263	516	526
10	5	25,0	0,258	0,236	516	472

Примечание: ϵ растворов **ДФБ** ($\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$): в 0,02М этанольном растворе H_2SO_4 – 663; в $4 \cdot 10^{-3}$ М водном растворе NaOH - 418; в среде 95% этанол – вода (1:1) с LiClO_4 – 761.

Образование солевых комплексов **ДФБ** с меглумином в растворе также изучено с использованием ^{31}P -ЯМР-спектров (рисунок 3.25). Химический сдвиг фосфора при С-3 атоме **ДФБ**, равный -0,58 м.д. (дублет без развязки от протонов), изменялся в комплексе с меглумином (1:2) до +0,88 м.д., а химический сдвиг фосфора при С-28 атоме, равный +0,28 м.д. (триплет без развязки от протона), – до +2,46 м.д. Изменения в спектрах зависят от соотношения **ДФБ**:меглумин при возрастании доли амина: при составе **ДФБ**:меглумин 1:4 отмечались сигналы +3,39 м.д. (фосфор при С-3) и +4,60 (фосфор при С-28) (рисунок 3.25). Увеличение доли меглумина больше чем **ДФБ**:меглумин 1:4 не изменяло вид спектра.

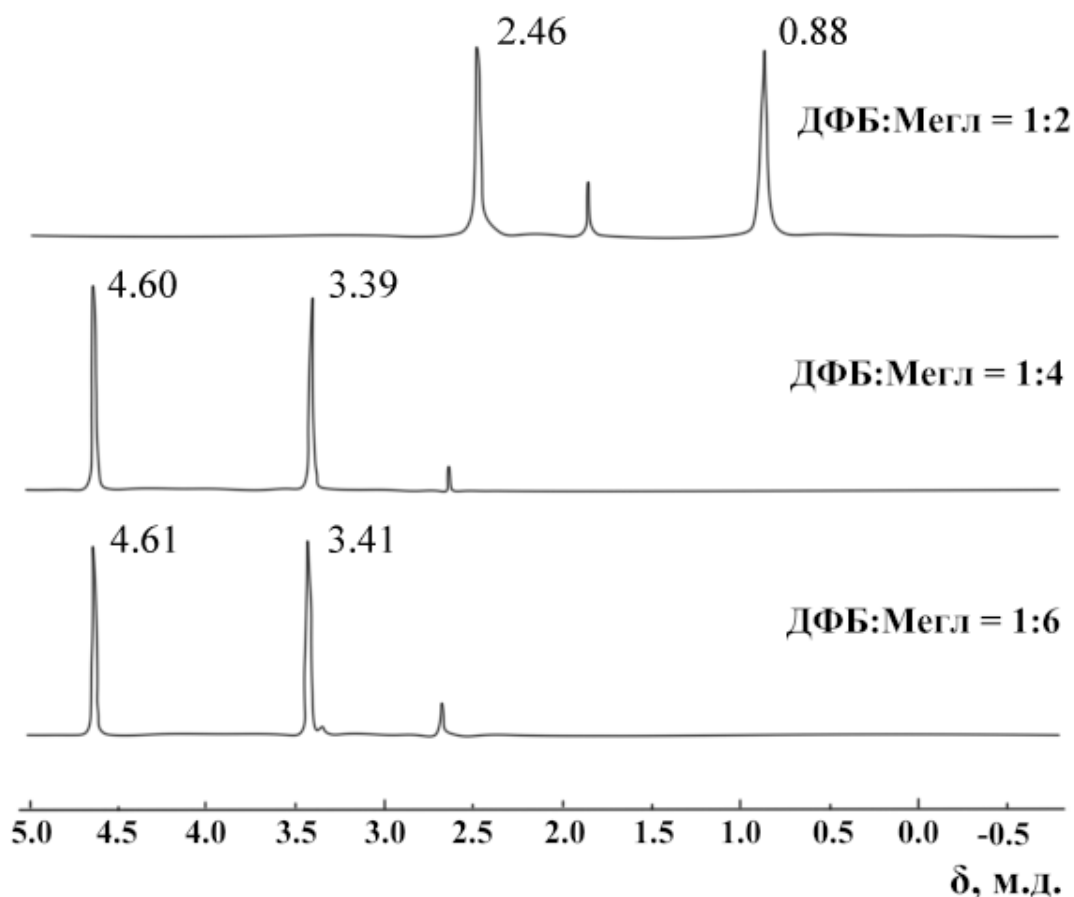


Рисунок 3.25 – Спектры ^{31}P -ЯМР комплексов ДФБ-Меглумин в D_2O , стандарт – H_3PO_4

Наиболее доказательным результатом комплексообразования ДФБ с меглумином является улучшение растворимости в воде (таблица 3.9).

Таблица 3.9

Растворимость в воде ДФБ и его производных при 20°C согласно ВЭЖХ-анализу

Вещество	СДФБ, г/л
ДФБ ^а	0,15
ДФБ ^б	0,09
Na-ДФБ ^а	10,00
Na-ДФБ ^б	4,00
ДФБ : Кси (молярное соотношение 1:4)	0,30
ДФБ ^а : Мегл (молярное соотношение 1:4)	59,00
ДФБ ^б : Мегл (молярное соотношение 1:4)	35,00

^а свежеприготовленный

^б после хранения в течение 3 месяцев

Растворимость свежеприготовленного ДФБ (спирторастворимой фракции) в воде при 20°C равна 0,15 г/л, а растворимость ДФБ после хранения в течение 3 месяцев уменьшилась до 0,09 г/л. Растворимость в воде свежеприготовленного **Na-ДФБ** составляла 10,00 г/л, а при хранении снижалась до 4,00 г/л. Можно предположить, учитывая результаты, изложенные в разделах 3.1 и 3.2, что в процессе хранения не только уменьшается количество гидратной воды, но и происходит изменение структурных модификаций как ДФБ, так и его натриевой соли. Растворение ДФБ в присутствии меглумина при их молярном соотношении 1:4 позволяет существенно увеличить его растворимость. Растворимость в воде свежеприготовленного ДФБ (спирторастворимой фракции) в комплексе с меглумином (молярное соотношение 1:4) была равна 59,00 г/л, а образец ДФБ после хранения в течение 3 месяцев в комплексе с меглумином имел растворимость, равную 35,00 г/л. Поскольку в этих же условиях растворимость ДФБ в водном растворе ксимедона (рКа 3,26) и трисамина (рКа 8,07) значительно ниже, то, вероятно, большое влияние на растворение ДФБ оказывает природа аминспирта, характер взаимодействия его с водой и величина его рКа (рКа меглумина 9,52).

Таким образом, данные УФ и ³¹P-ЯМР спектроскопии, а также увеличение растворимости в воде подтверждают образование комплексов 3,28-дифосфата бетулина с меглумином.

Выводы по главе 3

1. Впервые выявлены структурные модификации 3,28-дифосфата бетулина и его натриевой соли, определяющие их физико-химические свойства, главным из которых является растворимость. Методами ДСК и ТГ, Фурье-ИК-спектрами показано, что появление структурных модификаций обусловлено топохимическими процессами. Фурье-ИК и теплофизические характеристики (ΔH) обязательны для установления подлинности натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина как субстанции.

2. Солевые комплексы **ДФБ** с трисамином и меглумином существенно улучшают растворимость, в частности комплексы свежеприготовленного **ДФБ** (спирторастворимая фракция) с меглумином имеют растворимость в воде 59 г/л, что почти в 600 раз больше растворимости в воде **ДФБ**.

ГЛАВА 4. СТАНДАРТИЗАЦИЯ НАТРИЕВОЙ СОЛИ 3,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА

Стандартизацию потенциальной фармацевтической субстанции - натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина (**Na-ДФБ**) проводили, используя методики установления качества по показателям «Подлинность», «Количественное определение», по показателям содержания примесей, в том числе родственных и неспецифических в соответствии с Руководством по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений [121].

4.1. Методики установления подлинности натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина

В ходе проведенных исследований, описанных в Разделе 3.1, показано, что ИК, УФ и ^1H , ^{13}C , ^{31}P -ЯМР-спектральные методы анализа позволяют однозначно провести идентификацию **Na-ДФБ**. Свойства спектров сравнивались со стандартным образцом **Na-ДФБ** ($\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}$), синтезированным и охарактеризованным в лаборатории кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

ИК-спектры получали для **Na-ДФБ** в таблетках KBr, в диапазоне 400-4000 cm^{-1} ; $\Delta\nu \pm 0,1 \text{ cm}^{-1}$. ИК-спектр исследуемого образца должен совпадать со спектром $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}$. Совпадение спектров анализируемого и стандартного образцов должно наблюдаться в области «отпечатков пальцев» (650-1300 cm^{-1}), а также в области, отвечающей валентным колебаниям фосфорильных – P-OH 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} (широкая сильная полоса).

В таблице 4.1 показаны ИК-спектры, характеризующие специфичность спектрального метода определения подлинности **Na-ДФБ** по сравнению со спектрами **ДФБ** и бетулина – структурно близких веществ и потенциальных примесей.

Таблица 4.1

Специфичность ИК-спектрального метода установления
подлинности **Na-ДФБ**

СО веществ	ν , см ⁻¹ (Т,%)			
	3500-3300	1660-1400	970-990	500-480
Na-ДФБ	3500-3200 (95), широкая	1680-1640 (75), интенсивная	977 (95), интенсивная	680-450 (75), широкая, интенсивная
ДФБ	3420 (45), узкая	1700-1630 (38), несколько полос	984-973 (75), интенсивная	550-450 (45), несколько полос
бетулин	3380 (75), узкая	1646 (40), узкая	-	-

УФ-спектры получали для **Na-ДФБ**, растворенной в воде ($5 \cdot 10^{-4}$ М). УФ-спектр исследуемого образца должен совпадать со спектром $CO_{Na-ДФБ}$, и иметь максимум поглощения $A_{max} = 0,530 \pm 0,005$ при 256 нм; $\Delta\lambda \pm 0,1$ нм. В таблице 4.2 показана специфичность УФ-спектрального метода определения подлинности **Na-ДФБ** по сравнению со спектрами **ДФБ** и бетулина – структурно близких веществ и потенциальных примесей.

Таблица 4.2

Специфичность УФ-спектрального метода установления
подлинности **Na-ДФБ**

Вещество	Среда	A_{210}	A_{256}
ДФБ	95% этанол	0,011	0,504
Na-ДФБ		0,008	0,012
Бетулин		0,012	0,011
ДФБ	Вода	0,015	0,010
Na-ДФБ		0,056	0,505
Бетулин		0,011	0,013
ДФБ	1% раствор меглумина	0,052	0,250
Na-ДФБ		0,054	0,255
Бетулин		0,018	0,011

Идентификацию **Na-ДФБ** с использованием ^1H , ^{13}C , ^{31}P -ЯМР-спектров проводили в растворах DMSO-d_6 и D_2O в присутствии стандартов тетраметилсилана (ТМС, для ^1H , ^{13}C -ЯМР-спектров) и трифенилфосфина (Ph_3P , для ^{31}P -ЯМР-спектров). Полученные спектры должны совпадать со спектрами $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}$ (рисунок 3.7) и содержать сигналы С-3 в виде дублета ($\delta = -0,61$ м.д.) и С-28 в виде неразрешенного триплета ($\delta = 0,28$ м.д.) в DMSO-d_6 , а в D_2O сигналы С-3 ($\delta = 4,28$ м.д.) и С-28 ($\delta = 5,47$ м.д.).

Подлинность **Na-ДФБ** и потенциальной примеси **ДФБ** устанавливали с помощью дифференциального сканирующего калориметрического метода, неопределенность измерения температуры $u(T) = 0,5^\circ\text{C}$. ДСК-кривые образцов **Na-ДФБ** должны совпадать с кривыми $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}$ и иметь эндотермический эффект с максимумом при $103,7 \pm 8,0^\circ\text{C}$, в отличие от ДСК-кривых **ДФБ**, характеризующихся проявлением двух экзо-эффектов в области $137-161^\circ\text{C}$ и в области $185-200^\circ\text{C}$.

Структурные модификации **Na-ДФБ** имеют слабо кристаллическую или кристаллическую природу, в отличие от аморфных структурных модификаций **ДФБ**, что необходимо устанавливать методом порошковой рентгеновской дифрактометрии. Дифрактограммы образцов **Na-ДФБ** сравнивают с $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}$ в 2θ диапазоне $5-50^\circ$ с шагом $0,026^\circ$, со скоростью сканирования $0,067335$ ($^\circ/\text{с}$).

Величина рН водных растворов **Na-ДФБ** (5 г/л) должна соответствовать рН 7-8, в отличие от **ДФБ**, водная суспензия которого (5 г/л) имеет рН 2-4, $\Delta\text{pH} = \pm 0,05$.

Общегрупповой реакцией тритерпеновых соединений лупанового ряда является реакция с концентрированной серной кислотой и ванилином в спиртовом или спиртово-водном растворе, характеризующаяся появлением розово-красной окраски.

Реакция подлинности на ион натрия – образование плотного белого осадка при реакции с калия пироксидом при кипении в присутствии 15% раствора калия карбоната.

4.2. Количественное определение натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина

Количественное определение **Na-ДФБ** проводили по содержанию фосфора молибдатным методом (ГФ XIII) и с использованием ОФ-ВЭЖХ анализа.

4.2.1. Количественное определение натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина методом ВЭЖХ

Хроматограмма **Na-ДФБ** и градуировочный график представлены на рисунке 4.1.

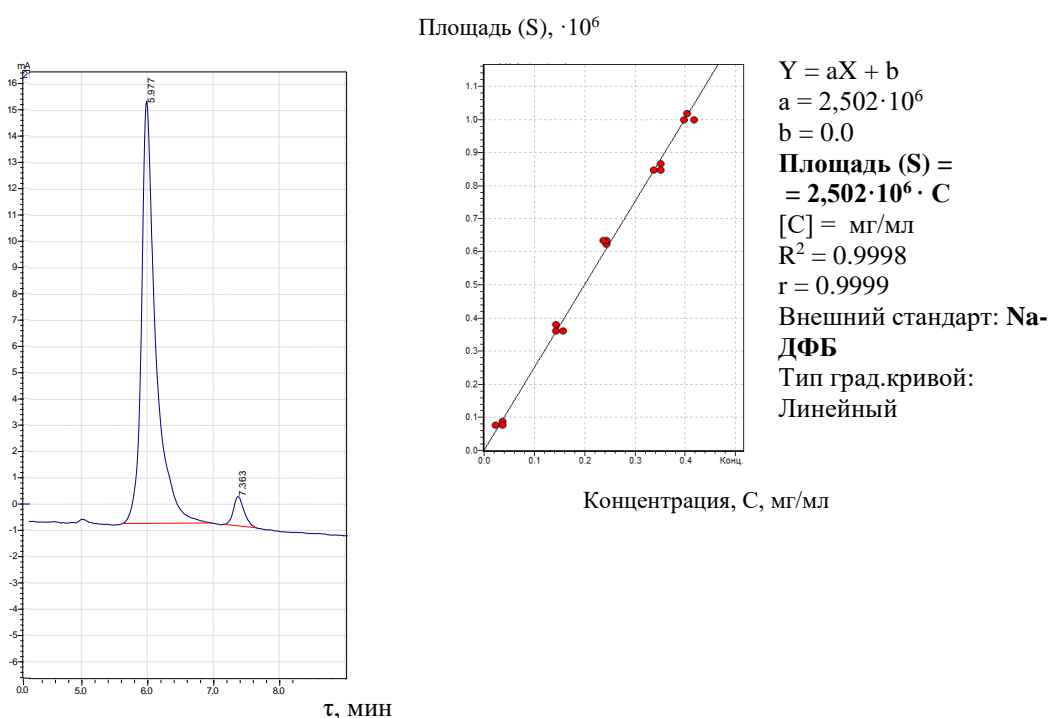


Рисунок 4.1 – Хроматограмма 0,01% водного раствора **Na-ДФБ-1** (20 мкл) и градуировочный график Площадь (S) = f(C_(мг/мл)) **Na-ДФБ** (стандарт).

Анализ семейства хроматограмм показал, что анализируемая система удовлетворяет показателю «Пригодность хроматографической системы», что выражается в следующем. Эффективность, выраженная числом теоретических

тарелок N , равна 4693 (должно быть N больше 2000). Соблюдается линейный характер градуировочной прямой ($R^2 = 0.9998$). Линейность разработанной методики доказана в пределах концентраций соединения 0,03-0,40 мг/мл; коэффициент корреляции 0,999. Уравнение линейной регрессии имело вид $Y = aX + b$, где $a = 2,502 \cdot 10^6$, $b = 0,0$ (рисунок 4.1). Отношение сигнал:шум больше, чем 10:1 во всем анализируемом диапазоне концентраций, время выхода **Na-ДФБ** совпадает со временем выхода $CO_{Na-ДФБ}$. Аналитические растворы оставались стабильными в течение суток и не влияли на результаты анализа. Изменения температуры в интервале 30-50°C и скорости потока 0,8-1,2 мл/мин несущественно влияли на результаты измерений.

Установлено, что методика количественного определения натриевой соли дифосфата бетулина является избирательной и селективной, наблюдается четкое разделение пиков анализируемого соединения и возможных примесей – $R_s = 4,24$ по отношению к примеси при требовании R_s более 1,5 (таблица 4.3), и имеет диапазон применения от 70 до 130%. Предел обнаружения (ПО) – 0,01 мг/мл; предел количественного определения – 0,03 мг/мл.

Таблица 4.3

Параметры, характеризующие пригодность хроматографической системы

Вещество	Время удерживания, мин	Коэффициент разделения пиков R_s	Эффективность колонки (N), тт	RSD площади пика, %
Na-ДФБ	5,98±0,05	4,24	4693	0,742
Неизвестная примесь	7,36±0,03		9286	0,992

Рассчитанный коэффициент вариации RSD, равный 0,742%, свидетельствует о том, что предлагаемая методика ВЭЖХ удовлетворяет показателю прецизионности (таблица 4.4).

Таблица 4.4

Стандартное отклонение результата измерений

Номер пика	Площадь пика	Сред. площадь пика, S_{cp}	Стандартное отклонение результата измерений, S_x	Коэффициент вариации RSD, %
S ₁	250431	251073	1862,547	0,742
S ₂	249077			
S ₃	253452			
S ₄	250178			
S ₅	248794			
S ₆	254129			
S ₇	250206			
S ₈	252342			
S ₉	251045			

При определении правильности методики оценивали открываемость известного количества **Na-ДФБ** в водных растворах. Исследования проведены на трех уровнях концентраций. Границы открываемости не выходят за пределы 90-110% (таблица 4.5).

Таблица 4.5

Оценка правильности методики определения **Na-ДФБ**

Содержание Na-ДФБ в растворе, мг/мл	Открываемость (R), %	Метрологические характеристики (P = 0,95; n = 6)				
		n	R_{cp}	SD	RSD	ΔE
0,010	96,97; 97,23; 97,01; 96,91; 99,34; 98,15	6	97,6	0,396	0,99	1,584
0,014	97,53; 96,97; 97,44; 99,81; 97,75; 98,18	6	97,94	0,4056	0,9949	1,6224
0,019	97,78; 97,02; 96,97; 96,04; 98,15; 98,67	6	98,152	0,3985	0,9724	1,594

Оценка неопределенности измерений количественного содержания **Na-ДФБ** методом ВЭЖХ анализа была выполнена в соответствии с Руководством [121].

Количественное содержание **Na-ДФБ** рассчитывают по формуле:

$$\begin{aligned} \text{NaДФБ, \%} &= \frac{\text{Ср.}S \text{ образца}}{\text{Ср.}S \text{ стандарта}} \times \frac{\text{Разб-е стандарта}}{\text{Разб-е образца}} \times \text{Сод-е стандарта} \times \frac{100}{(100-\text{ПО})} = \\ &= \frac{\text{Ср.}S_x}{\text{Ср.}S_{\text{ст}}} \times \frac{m_{\text{ст}} \cdot V_{\text{кол ст}} \cdot V_{\text{ал } x}}{m_x \cdot V_{\text{ал ст}} \cdot V_{\text{кол } x}} \times \text{СОД}_{\text{ст}} \times \text{Ч}_{\text{ст}} \times \frac{100}{(100-\text{ПО})} [\%], \quad (4.1) \end{aligned}$$

где все обозначения соответствуют указанным в таблице 4.6; ПО – предел обнаружения **Na-ДФБ** методом ВЭЖХ, %; содержание стандартного образца $\text{СОД}_{\text{ст}}$ равно 100%.

Количественное содержание **Na-ДФБ** в соответствии с формулой 4.1 составило:

$$\text{NaДФБ, \%} = \frac{244176}{250180} \times \frac{0,05 \cdot 100 \cdot 20}{0,05 \cdot 20 \cdot 100} \times 100 \times 1,0 \times \frac{100}{(100-0,001)} = 97,6\%$$

Суммарную стандартную неопределенность $u(\text{NaДФБ, \%})$ при расчете количественного содержания **Na-ДФБ** оценивали, учитывая сумму стандартных неопределенностей, вносимых погрешностями приборов (весы, ВЭЖ хроматограф), мерной посуды, разбавления, чистоты стандартного образца и других факторов (таблица 4.6).

$$u(\text{NaДФБ, \%}) = \sqrt{\sum_i c^2 u^2(x)} \quad (4.2),$$

где значения x отнесены к измеряемым параметрам, представленным в таблице 4.6; c – эмпирические коэффициенты, принятые в данном случае за 1.

Алгоритм расчета суммарной неопределенности представлен ниже.

1.) Неопределенности $u(\text{Ср.}S_x)$ и $u(\text{Ср.}S_{\text{ст}})$, вносимые средней площадью пика образца **Na-ДФБ** ($\text{Ср.}S_x$) и $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}$ ($\text{Ср.}S_{\text{ст}}$), соответственно, рассчитывали, принимая во внимание:

- значение $\pm 1,5\%$ для составляющей нелинейности, заданное производителем ВЭЖ хроматографа, что составляет 3663 для $\text{Ср.}S_x$ и 3753 для $\text{Ср.}S_{\text{ст}}$.
- внутри указанного интервала ($\pm 1,5\%$) значения составляющих $u(\text{Ср.}S_x)$ и $u(\text{Ср.}S_{\text{ст}})$ могут быть описаны прямоугольным равномерным распределением $2a = 3$ (полушириной $a = 1,5$) [121, Приложение E].

В соответствии с этими допущениями стандартные неопределенности, вносимые средней площадью пика, будут равны:

$$u(\text{Cp}.S_x) = 3663/\sqrt{3} = 2115$$

$$u(\text{Cp}.S_{\text{CT}}) = 3753/\sqrt{3} = 2167$$

Таблица 4.6

Значения факторов и их неопределенности в количественном определении **Na-ДФБ** методом ВЭЖХ

	Наименование	Значение x	Стандартная неопределенность $u(x)$	Относительная стандартная неопределенность $u(x)/x$
$\text{Cp}.S_x$	Средняя площадь пика образца Na-ДФБ	244176	2115	0,00866
$\text{Cp}.S_{\text{CT}}$	Средняя площадь пика $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}$	250180	2167	0,00866
m_{CT}	Масса $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}$	0,05 г	0,00008 г	0,00160
m_x	Масса образца Na-ДФБ	0,05 г	0,00008 г	0,00160
Ч_{CT}	Степень чистоты $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}$	1,0	0,00428	0,00428
$V_{\text{кол ст}}$	Объем колбы с раствором Na-ДФБ	100,00 мл	0,041 мл	0,00041
$V_{\text{ал ст}}$	Объем аликвоты раствора $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}$	20,00 мл	0,041 мл	0,00205
$V_{\text{кол } x}$	Объем колбы с раствором Na-ДФБ	100,00 мл	0,041 мл	0,00041
$V_{\text{ал } x}$	Объем аликвоты раствора Na-ДФБ	20,00 мл	0,041 мл	0,00205

2.) Неопределенности $u(m_{\text{CT}})$ и $u(m_x)$, вносимые массой $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}$ (m_{CT}) и образца **Na-ДФБ** (m_x), соответственно, рассчитывали, учитывая значение $\pm 0,1$ мг для составляющей нелинейности, указанное производителем весов, а также прямоугольное равномерное распределение внутри указанного интервала. Значения $u(m_{\text{CT}})$ и $u(m_x)$ составляли $0,1/\sqrt{3} = 0,058$ мг.

Вклад нелинейности учитывали дважды: один раз при взвешивании тары и второй раз при взвешивании вещества с тарой, что приводит в итоге к неопределенности:

$$u(m_{\text{CT}}) = u(m_x) = \sqrt{2 \cdot (0,058)^2} = 0,082 \text{ мг}$$

3.) Неопределенность $u(\text{Ч}_{\text{ст}})$, вносимая степенью чистоты $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}(\text{Ч}_{\text{ст}})$.

Степень чистоты $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}$ составляет $100\% \pm 0,742\%$. Предполагая прямоугольное распределение, можно рассчитать:

$$u(\text{Ч}_{\text{ст}}) = 0,00742/\sqrt{3} = 0,004284$$

4.) Неопределенности $u(V_{\text{кол ст}})$ и $u(V_{\text{кол х}})$, вносимые объемами колб с растворами $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}(V_{\text{кол ст}})$ и образца **Na-ДФБ** ($V_{\text{кол х}}$) оценивают, принимая треугольную функцию распределения [121, Приложение Е], в соответствии с которой:

$$u(x) = a/\sqrt{6} \quad (4.3)$$

С учетом предельных отклонений $\pm 0,10$ мл, указанных производителем мерной колбы объемом 100 мл:

$$u(V_{\text{кол ст}}) = u(V_{\text{кол х}}) = 0,1/\sqrt{6} = 0,041 \text{ мл}$$

5.) Неопределенности $u(V_{\text{кол ст}})$ и $u(V_{\text{кол х}})$, вносимые объемами аликвот растворов $\text{CO}_{\text{Na-ДФБ}}(V_{\text{кол ст}})$ и образца **Na-ДФБ** ($V_{\text{кол х}}$) рассчитывали, используя треугольную функцию распределения и значения предельных отклонений, указанных производителем градуированной пипетки объемом 25 мл, $\pm 0,10$ мл:

$$u(V_{\text{кол ст}}) = u(V_{\text{кол х}}) = 0,1/\sqrt{6} = 0,041 \text{ мл}$$

6.) Оценивали относительную стандартную неопределенность $u(x)/x$ для всех ранее рассчитанных по пунктам 1-5 неопределенностей. Данные указаны в таблице 4.6.

7.) Относительную суммарную стандартную неопределенность $\frac{u(\text{NaДФБ, \%})}{\text{NaДФБ, \%}}$, вносимую в количественное определение **Na-ДФБ**, вычисляли:

$$\begin{aligned} \frac{u(\text{NaДФБ, \%})}{\text{NaДФБ, \%}} &= \\ &= \sqrt{\left(\frac{u(\text{Ср.}S_x)}{\text{Ср.}S_x}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Ср.}S_{\text{ст}})}{\text{Ср.}S_{\text{ст}}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{\text{ст}})}{m_{\text{ст}}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_x)}{m_x}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Ч}_{\text{ст}})}{\text{Ч}_{\text{ст}}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{\text{кол ст}})}{V_{\text{кол ст}}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{\text{ал ст}})}{V_{\text{ал ст}}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{\text{кол х}})}{V_{\text{кол х}}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{\text{ал х}})}{V_{\text{ал х}}}\right)^2} = \\ &= \sqrt{0,00866^2 + 0,00866^2 + 0,00160^2 + 0,00160^2 + 0,00428^2 + 2 \times (0,00041^2 + 0,00205^2)} = \\ &= 0,0135 \end{aligned}$$

Суммарную стандартную неопределенность $u(\text{NaДФБ, \%})$, вносимую в количественное определение **Na-ДФБ**, оценивали:

$$u(\text{NaДФБ, \%}) = \text{NaДФБ\%} \cdot \frac{u(\text{NaДФБ, \%})}{\text{NaДФБ, \%}} = 97,6\% \cdot 0,0135 = 1,31\%$$

Расширенную неопределенность $U(\text{NaДФБ, \%})$ получали путем умножения суммарной стандартной неопределенности $u(\text{NaДФБ, \%})$ на коэффициент охвата, равный 2:

$$U(\text{NaДФБ, \%}) = u(\text{NaДФБ, \%}) \cdot 2 = 1,31\% \cdot 2 = 2,62\%$$

Следовательно, количественное содержание **Na-ДФБ** с учетом неопределенности равно $(97,6 \pm 2,62)\%$.

4.2.2. Количественное определение натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина по содержанию фосфора

Количественное определение **Na-ДФБ** по содержанию фосфора молибдатным методом (ГФ XIII) проводили с использованием в качестве стандартного образца фитата натрия ($\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$) с содержанием фосфора 22%. Расчет количественного содержания фосфора P_x (%) в образце проводили по следующей формуле:

$$P_x (\%) = \frac{A_x}{A_{\text{ст}}} \cdot \frac{m_{\text{ст}}(\text{г}) \cdot P_{\text{ст}}}{m_x(\text{г})} \cdot 100, \quad (4.4)$$

где:

$P_{\text{ст}} = 0,22$ – доля фосфора в стандарте фитате натрия;

$m_{\text{ст}}(\text{г})$ – масса стандарта, взятого для анализа;

$m_x(\text{г})$ – масса предварительно высушенного до постоянной массы образца: при 160°C для **Na-ДФБ** и 105°C для **ДФБ**;

A_x и $A_{\text{ст}}$ – поглощение растворов исследуемого образца и стандарта при 725 нм.

Рассчитанный коэффициент вариации RSD, равный 1,193%, свидетельствует о том, что предлагаемая методика измерения поглощения растворов **Na-ДФБ** удовлетворяет показателю прецизионности (Таблица 4.7).

Таблица 4.7

Стандартное отклонение результата измерений поглощения

$5 \cdot 10^{-4}$ М растворов **Na-ДФБ**

Номер спектра	Поглощение, A	Сред. поглощение, A_{cp}	Стандартное отклонение результата измерений, S_x	Коэффициент вариации RSD, %
A ₁	0,531	0,530	0,00632	1,193
A ₂	0,539			
A ₃	0,532			
A ₄	0,523			
A ₅	0,525			

Оценка содержания **Na-ДФБ** (г) после пересчета содержания фосфора (%) в безводной субстанции (высушивание при 160°C над CaO в течение нескольких часов) составляет:

$$m_x = \frac{A \cdot P_{ст} \cdot m_{ст} \cdot \chi_{ст} \cdot V_{ал ст} \cdot V_{кол x}}{A_0 \cdot P_x \cdot V_{кол ст} \cdot V_{ал x}} \quad [г], \quad (4.5)$$

где все обозначения соответствуют указанным в таблице 4.8; P_x – рассчитанное по формуле (4.4) содержание фосфора в безводном **Na-ДФБ** – (8,99±0,25)% (n = 5).

Количественное содержание **Na-ДФБ** (г) в соответствии с формулой 4.5 составило:

$$m_x = \frac{0,530 \cdot 22,0 \cdot 0,0180 \cdot 1,0 \cdot 15,00 \cdot 100,00}{0,363 \cdot 8,99 \cdot 100,00 \cdot 15,00} = 0,0643 \text{ г}$$

Оценка суммарной неопределенности содержания **Na-ДФБ** требует также учета чистоты стандарта и разведения (объемы колб и пипеток).

Алгоритм расчета суммарной неопределенности представлен ниже и проводится аналогично приведенному в разделе 4.2.1.

1.) Неопределенности $u(A_x)$ и $u(A_{ст})$, вносимые поглощением растворов **Na-ДФБ** (A_x) и $InsP_6Na_2 \cdot y H_2O$ ($A_{ст}$) рассчитывали, используя четырехугольную

функцию распределения и значение $\pm 0,002$ для составляющей нелинейности поглощения, указанное производителем УФ-спектрофотометра:

$$u(A_x) = u(A_{ст}) = 0,002/\sqrt{3} = 0,00115$$

Таблица 4.8

Значения факторов и их неопределенности в количественном определении **Na-ДФБ** по содержанию фосфора

	Наименование	Значение x	Стандартная неопределенность $u(x)$	Относительная стандартная неопределенность $u(x)/x$
A_x	Поглощение раствора Na-ДФБ	0,530	0,00115	0,00216
$A_{ст}$	Поглощение раствора $\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$	0,363	0,00115	0,00317
$m_{ст}$	Масса $\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$	0,0180 г	0,00008 г	0,00456
$\text{Ч}_{ст}$	Степень чистоты $\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$	1,0	0,00029	0,00029
$P_{ст}$	Содержание фосфора в $\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$	22,00%	0,29%	0,01318
$V_{\text{кол ст}}$	Объем колбы с раствором $\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$ после минерализации	100,00 мл	0,041 мл	0,00041
$V_{\text{ал ст}}$	Объем аликвоты раствора $\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$	15,00 мл	0,041 мл	0,00273
$V_{\text{кол } x}$	Объем колбы с раствором Na-ДФБ после минерализации	100,00 мл	0,041 мл	0,00041
$V_{\text{ал } x}$	Объем аликвоты раствора Na-ДФБ	15,00 мл	0,041 мл	0,00273
	Навеска Na-ДФБ	0,0652 г		

2.) Неопределенность $u(m_{ст})$, вносимая массой $\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$ ($m_{ст}$) рассчитывали, учитывая значение $\pm 0,1$ мг для составляющей нелинейности, указанное производителем весов, а также прямоугольное равномерное распределение внутри указанного интервала. Значение $u(m_{ст})$ составило $0,1/\sqrt{3} = 0,058$ мг.

Вклад нелинейности учитывали дважды: один раз при взвешивании тары и второй раз при взвешивании вещества с тарой, что приводит в итоге к неопределенности:

$$u(m_{\text{ст}}) = \sqrt{2 \cdot (0,058)^2} = 0,082 \text{ мг}$$

3.) Неопределенность $u(\text{Ч}_{\text{ст}})$, вносимая степенью чистоты $\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$ ($\text{Ч}_{\text{ст}}$) рассчитывали, принимая во внимание функцию прямоугольного распределения, а также приведенную в сертификате поставщика степень чистоты $\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$, равную $100\% \pm 0,05\%$:

$$u(\text{Ч}_{\text{ст}}) = 0,0005/\sqrt{3} = 0,00029$$

4.) Неопределенность $u(\text{P}_{\text{ст}})$, вносимая содержанием фосфора в $\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$ ($\text{P}_{\text{ст}}$) рассчитывали, принимая во внимание функцию прямоугольного распределения, а также указанное в сертификате поставщика содержание фосфора в $\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$, равное $22,0 \pm 0,5\%$:

$$u(\text{P}_{\text{ст}}) = 0,5/\sqrt{3} = 0,29\%$$

5.) Неопределенности $u(\text{V}_{\text{кол ст}})$ и $u(\text{V}_{\text{кол х}})$, вносимые объемами колб с растворами **Na-ДФБ** ($\text{V}_{\text{кол х}}$) и $\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$ ($\text{V}_{\text{кол ст}}$) после минерализации оценивают, принимая треугольную функцию распределения с учетом предельных отклонений $\pm 0,10$ мл, указанных производителем мерной колбы объемом 100 мл:

$$u(\text{V}_{\text{кол ст}}) = u(\text{V}_{\text{кол х}}) = 0,1/\sqrt{6} = 0,041 \text{ мл}$$

6.) Неопределенности $u(\text{V}_{\text{ал ст}})$ и $u(\text{V}_{\text{ал х}})$, вносимые объемами аликвот растворов **Na-ДФБ** ($\text{V}_{\text{ал х}}$) и $\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$ ($\text{V}_{\text{ал ст}}$) оценивают, принимая треугольную функцию распределения с учетом предельных отклонений $\pm 0,10$ мл, указанные производителем градуированной пипетки:

$$u(\text{V}_{\text{ал ст}}) = u(\text{V}_{\text{ал х}}) = 0,1/\sqrt{6} = 0,041 \text{ мл}$$

7.) Вычисление относительной суммарной стандартной неопределенности $\frac{u(m_x)}{m_x}$:

$$\begin{aligned} \frac{u(m_x)}{m_x} &= \\ &= \sqrt{\left(\frac{u(A_x)}{A_x}\right)^2 + \left(\frac{u(A_{\text{ст}})}{A_{\text{ст}}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{\text{ст}})}{m_{\text{ст}}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Ч}_{\text{ст}})}{\text{Ч}_{\text{ст}}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{P}_{\text{ст}})}{\text{P}_{\text{ст}}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{V}_{\text{кол ст}})}{\text{V}_{\text{кол ст}}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{V}_{\text{ал ст}})}{\text{V}_{\text{ал ст}}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{V}_{\text{кол х}})}{\text{V}_{\text{кол х}}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{V}_{\text{ал х}})}{\text{V}_{\text{ал х}}}\right)^2} \end{aligned}$$

$$= \sqrt{0,00216^2 + 0,00317^2 + 0,00456^2 + 0,00029^2 + 0,01318^2 + 2 \times (0,00041^2 + 0,00273^2)} =$$

$$= 0,0150$$

Используя величину относительной суммарной стандартной неопределенности $\frac{u(m_x)}{m_x}$, вычисляли величину суммарной стандартной неопределенности $u(m_x)$:

$$u(m_x) = m_x \cdot \frac{u(m_x)}{m_x} = 0,0643 \text{ г} \cdot 0,0150 = 0,00096 \text{ г}$$

Расширенную неопределенность $U(m_x)$ получают путем умножения суммарной стандартной неопределенности на коэффициент охвата, равный 2:

$$U(m_x) = 0,00096 \text{ г} \cdot 2 = 0,0019 \text{ г}.$$

Масса **Na-ДФБ** равна $(0,0643 \pm 0,0019)$ г, что составляет $(98,6 \pm 2,91)\%$ от взятой для анализа навески $(0,0652 \text{ г})$.

4.3. Методики определения примесей натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина

Основными примесями в субстанции **Na-ДФБ** являются **ДФБ** (0,01%) и бетулин ($< 0,001\%$) и вода ($< 0,5\%$ для кристаллогидрата).

Количественное содержание воды, включая воду в составе кристаллогидрата, в образце определяли термогравиметрическим анализом по величине первой ступени на ТГ-кривых, $u(T) = 0,5^\circ\text{C}$, и по потере массы после высушивания при 160°C над осушителем. Суммарное содержание воды не должно превышать 17%.

По результатам исследований разработан **проект фармакопейной статьи «Натриевая соль дифосфата бетулина»** (Приложение б).

ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 3,28-ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА В ВИДЕ ЕГО НАТРИЕВОЙ СОЛИ И СОЛЕВЫХ КОМПЛЕКСОВ С МЕГЛУМИНОМ

Бетулин и его производные обладают широким спектром биологической активности, что было рассмотрено в главе 1.

С другой стороны, производные бетулина представляют интерес как вещества, приводящие к уменьшению дозы токсичного ЛВ при совместном применении. Синергический эффект 5-фторурацила с природными соединениями, такими как полифенолы, тритерпеноиды (бетулиновая, урсоловая и олеаноловая кислоты) и флавоноиды (флаван и катехин), был показан в работах [122-127]. Подробно изучены тритерпеноидные кислоты (урсоловая, бетулиновая, олеаноловая кислоты), обеспечивающие комплексное действие с другими противоопухолевыми препаратами, такими как иринотекан и цисплатин. Особенностью действия названных природных соединений является более сильный синергетический эффект экстрактов, обогащенных смесью тритерпенов и флавоноидов, например, экстракта японского абрикоса, чем чистых тритерпеновых кислот [128].

5.1. Оценка влияния натриевых солей 3,28-дифосфата бетулина и солевых комплексов 3,28-дифосфата бетулина с аминами на антиоксидантную ферментную защиту *in vitro* на крови крыс

Биологические свойства растворов ДФБ оценивались по влиянию на антиоксидантную ферментную защиту *in vitro* на крови крыс по отношению к контролю (интактной крови крыс). Сравнение влияния солевых комплексов ДФБ с меглумином и ДФБ на активность супероксиддисмутазы, каталазы,

глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы выявило их дозозависимые эффекты (рисунок 5.1, таблица 5.1).

Таблица 5.1

Активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (% от контроля) под действием ДФБ, меглумина и ДФБ + меглумин в дозах 2, 5 и 10 мкг/мл

	Доза, мкг/мл	Активность, % от контроля			
		СОД	Каталаза	ГР	Г6ФД
ДФБ*	2	335±3	299±14	215±3	132±3
	5	304±4	269±9	179±3	267±4
	10	232±1	103±7	593±2	337±2
Меглумин	2	261±6	234±4	332±3	233±2
	5	233±2	182±8	243±3	99±3
	10	173±4	91±3	185±2	110±1
ДФБ+Меглумин	2	165±2	170±3	539±3	151±3
	5	215±2	237±5	704±4	188±5
	10	157±1	197±9	185±2	99±3

* ДФБ первоначально растворяли в 0,2М водном растворе NaOH до достижения нейтрального pH.

Показано, что активность всех ферментов под действием комплексных соединений ДФБ с меглумином, также как и его натриевых солей увеличивается практически при всех дозах по сравнению с контролем. Наиболее сильные эффекты комплексных соединений ДФБ с меглумином наблюдались по активности глутатионредуктазы в дозах 2 и 5 мкг/мл. Влияние на СОД и каталазу при этих дозах было более сильным для натриевой соли ДФБ.

Кроме того, уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) снижался под действием ДФБ, который уменьшал уровень малонового диальдегида в эритроцитах на 43±8% в дозе 2 мкг/мл крови и уровень малонового диальдегида в плазме на 52±12% в дозе 10 мкг/мл крови.

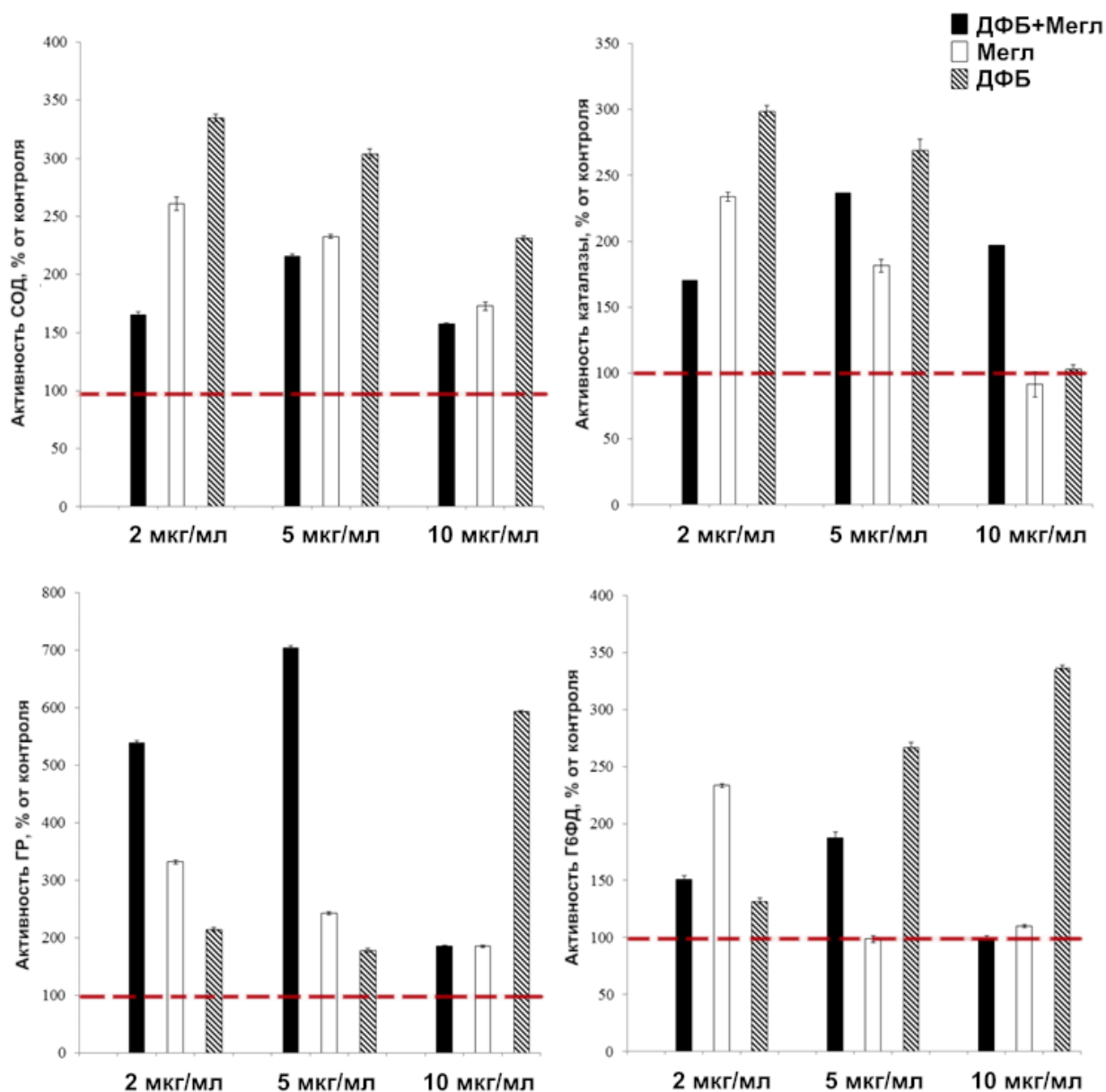


Рисунок 5.1 – Активность супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (% от контроля) под действием ДФБ, меглумина и ДФБ + меглумин в дозах 2, 5 и 10 мкг/мл

Таким образом, в экспериментах *in vitro* на крови крыс установлено ингибирование процессов перекисного окисления липидов, увеличение активности супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы, каталазы, 6-фосфатдегидрогеназы, под действием натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина и его комплексных соединений с меглумином по сравнению с контролем.

5.2. Исследование противоопухолевой активности в комбинированной терапии с 5-фторурацилом и гидразина сульфатом на модели привитой асцитной карциномы Эрлиха на мышах

Качество жизни пациентов является важной проблемой в онкологии, наравне с оптимальной фармакотерапией препаратами, лучевой терапией и (или) хирургическими вмешательствами. Использование современных высокоэффективных противоопухолевых препаратов имеет серьезные побочные эффекты с общим токсическим воздействием на организм [129-131].

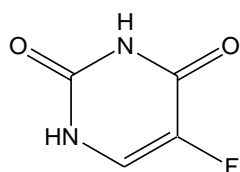
Токсическое воздействие противоопухолевых препаратов в значительной степени определяется их биодоступностью, которая зависит от гидрофильно-липофильного соотношения и растворимости лекарств. Как правило, хорошо водорастворимые вещества обладают более сильными системными токсическими эффектами. Современной тенденцией фармакотерапии является использование хорошо зарекомендовавших себя лекарств в новых лекарственных формах или новых методов введения, таких как селективная доставка, при которой доза противоопухолевых препаратов может быть резко снижена [132-134]. Недорогие лекарственные вещества, такие как гидразина сульфат (ГС) - Sehydrin® и 5-фторурацил (**5-ФУ**), характеризующиеся низким значением LD₅₀, близким к 0,32 мг/кг, представляют интерес как компонент новой лекарственной формы в клинической практике [128, 135]. **5-ФУ** ингибирует тимидилатсинтетазу, нарушает синтез нуклеиновых кислот и приводит к апоптозу опухолевых клеток. **5-ФУ** используется для лечения гепатоцеллюлярной и пищеводной карциномы человека, колоректального рака и рака поджелудочной железы и т. д. [125-126]. Гидразина сульфат (ГС) является недостаточно изученным противоопухолевым средством, хорошо зарекомендовавшим себя при лечении опухолей печени, легких, молочных желез, кишечника, шейки матки [136-138]. Механизм действия ГС включает как конкурентное ингибирование моноаминоксидазы, приводящее к увеличению

уровней биогенных аминов и аминокислот (допамина, серотонина), так и блокирование глюконеогенеза фосфоенол-пируваткин-карбоксилазой [139].

Природные соединения способны взаимодействовать с противоопухолевыми препаратами в синергии и могут быть другим компонентом лекарственной формы, которые приводят к уменьшению дозы препарата [140].

Бетулин-3,28-дифосфат в качестве компонента комбинированных препаратов был выбран из-за его способности действовать в качестве ингибитора комплемента, что является важным свойством противоопухолевых агентов [141]. Бетулин и его производные, такие как бетулиновая и бетулоновая кислоты, их сложные эфиры и амиды оказывают цитотоксическое действие на опухолевые клетки и низкую токсичность по отношению к неопухолевым клеткам. Противоопухолевая активность этих соединений была показана в экспериментах *in vitro* и *in vivo* при лечении меланомы, нейробластомы, гепатомы и т. д. [9, 143]. Антиоксидантные свойства играют важную роль в достижении противоопухолевого эффекта.

Мы изучали влияние комбинированных препаратов 5-фторурацила и гидразина сульфата с водорастворимым 3,28-дифосфатом бетулина в экспериментах *in vivo* на модели трансплантированной асцитной карциномы Эрлиха у мышей (АКЭ). Нами также изучены изменения энергетического метаболизма в экспериментах *in vitro* под действием ДФБ с 5-фторурацилом и гидразина сульфатом по активности лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях, поскольку эти показатели являются крайне важным при онкологических заболеваниях.



5-фторурацил (5-ФУ)



Гидразина сульфат (ГС)

Цитотоксическая защита от побочных эффектов противоопухолевых препаратов может усиливаться за счет способности димеров или тетрамеров ДФБ образовывать комплекс включения «ДФБ+ЛВ» (рисунок 5.2).

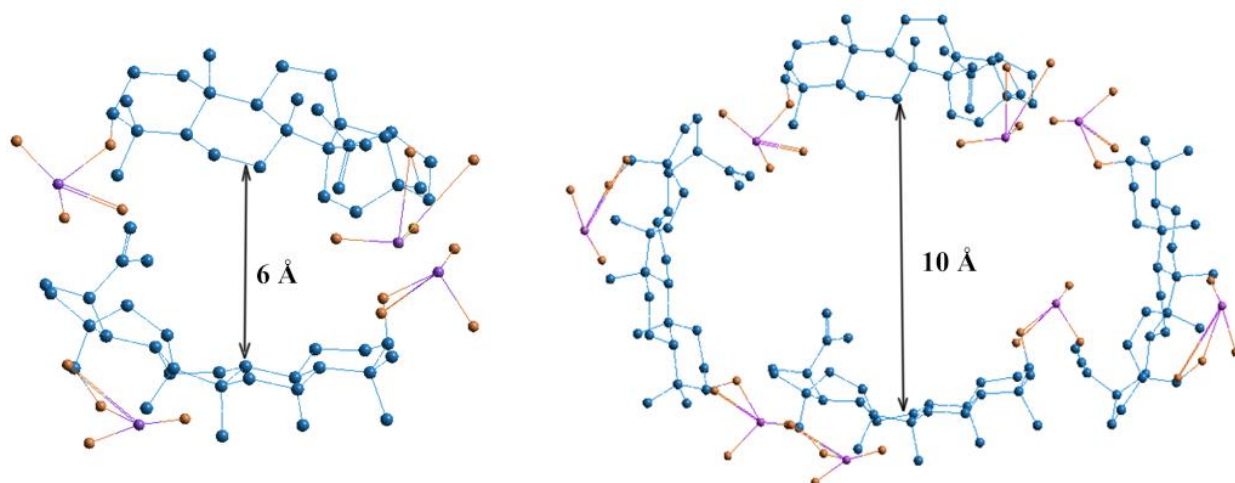


Рисунок 5.2 – Геометрическая визуализация ДФБ в качестве компонента комплекса включения, образованного двумя или четырьмя молекулами. Квантово-химические расчеты проведены в программе NucleoChem 8.0 (семиэмпирический метод AM1). Размер полости между молекулами ДФБ составляет 6 Å для димера и 10 Å для тетрамера.

5.2.1. Влияние 3,28-дифосфата бетулина на лечение карциномы Эрлиха комбинированными препаратами

Лечение карциномы Эрлиха у мышей комбинированными препаратами ДФБ+5-ФУ и ДФБ+ГС показало улучшение объективных показателей состояния животных (выживаемость, масса тела, шерсть, поведение, снижение кардиотоксичности). Все животные выжили в экспериментальных группах, в то время как в контрольных группах АКЭ-5-ФУ и АКЭ-ГС выживали не более $80 \pm 5\%$ животных.

Асцитическую жидкость аккуратно собирали в пластиковые трубки сначала шприцем из отверстия в брюшной полости, а затем из открытой с помощью ножниц

брюшной полости под наркозом («Золетил», 60 мкг/кг, «Ксила», 6 мг/кг) на 11-й день и после чего выдерживали в ледяной ванне.

Влияние ГС и **5-ФУ** и комбинированных препаратов **ДФБ+ГС** и **ДФБ+5-ФУ** на накопление асцитической жидкости было исследовано на 11-й день (таблица 5.2). Введение повторной суточной дозы по 0,2 мл на мышь (1,5 мг **ДФБ** и 0,32 мг **ГС** или **5-ФУ** на мышь) в течение 11 дней не выявило каких-либо аномальных поведенческих реакций. Мыши, которых лечили только **ГС** и **5-ФУ**, имели значительно худшее состояние здоровья (состояние шерсти, массу тела и поведение), чем в контрольной группе или группах **АКЭ-(ДФБ+5-ФУ)** и **АКЭ-(ДФБ+ГС)**.

Объем жидкости в Контрольной группе был незначительным, но объем жидкости в Контрольной группе **АКЭ** был очень большим. Объемы асцитической жидкости в группах **АКЭ-5-ФУ** и **АКЭ-ГС** были в полтора раза меньше объема **АКЭ**-контрольной группы. Напротив, объемы асцитической жидкости в группах комбинированных препаратов были в три раза меньше, чем объемы контрольной группы **АКЭ** на 11-й день.

Гистологический анализ не показал значительных изменений в тканях сердца в группах **АКЭ-(ДФБ+5-ФУ)** и **АКЭ-(ДФБ+ГС)**, тогда как дистрофические изменения и потеря поперечной страты в некоторых мышечных волокнах были отмечены в кардиомиоцитах группы **АКЭ**-контрольной группы.

Концентрация нейтрофилов и опухолевых клеток при лечении комбинированными препаратами **ДФБ+5-ФУ** и **ДФБ+ГС** была значительно ниже (таблица 5.2).

Согласно цитологическому исследованию асцитической жидкости после лечения комбинационными препаратами опухолевые клетки **ДФБ+ГС** и **ДФБ+5-ФУ** отсутствовали, тогда как опухолевые клетки наблюдались в контрольных группах **АКЭ-5-ФУ** и **АКЭ-ГС**.

Таблица 5.2

Влияние **5-ФУ**, **ГС** и комбинированных препаратов **ДФБ+5-ФУ** и **ДФБ+ГС** на биологические параметры мышей с АКЭ на 11-й день^{1,2}

	Выживаемость	Масса тела		Асцитическая жидкость (мл) на 11 день	Опухолевые клетки ³	Нейтрофилы ⁴
		день 1	день 11			
Контроль АКЭ	3/10	23.1± 0.6	29.2± 0.5	6.0±0.3	++	+++
АКЭ- 5-ФУ	8/10	21.8± 0.7	26.3± 1.1	4.0±0.5	+	++
АКЭ-ГС	6/10	22.3± 0.6	27.1± 0.9	4.5±0.4	+	++
АКЭ- (ДФБ+5-ФУ)	10/10	22.5± 0.5	25.3± 0.5	2.3±0.6	-	+
АКЭ- (ДФБ+ГС)	10/10	23.0± 0.5	26.2± 0.7	2.6±0.4	-	+
Контроль	10/10	24.5± 0.4	25.1± 0.3	0	-	+

Примечания:

¹ среднее значение ± стандартное отклонение (n=10)

² Аббревиатура: АКЭ – Асцитная карцинома Эрлиха (Ehrlich ascites carcinoma)

³ “-” отсутствие; “+” содержание опухолевых клеток больше, чем 5%; “++” содержание опухолевых клеток больше, чем 10%

⁴ “+” содержание нейтрофилов, соответствующее содержанию нейтрофилов здорового животного; “++” означает содержание нейтрофилов, в два раза большее, чем содержание нейтрофилов здорового животного; “+++” означает содержание нейтрофилов, в три раза большее, чем содержание нейтрофилов здорового животного

Таким образом, **ДФБ** в сочетании с **ГС** и **5-ФУ** улучшал состояние здоровья животных, а также уменьшал дозу **ГС** и **5-ФУ** при лечении АКЭ, что может быть использовано при паллиативной терапии.

5.2.2. Влияние комбинированных препаратов 3,28-дифосфата бетулина на энергетический метаболизм и антиоксидантную защиту в эритроцитах

Важным фактором, определяющим течение опухолевых заболеваний, является энергетический метаболизм в опухолевой клетке. В связи с этим нами

были проведены эксперименты *in vitro* по влиянию **ДФБ** на активность лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакции.

Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в прямой и обратной реакциях повышалась под влиянием чистых **5-ФУ** и **ГС** во всех дозах (таблица 5.3), что характеризует увеличение энергетического метаболизма в эритроцитах. Под влиянием чистых **5-ФУ** и **ГС** в дозе 2 мкг/мл активность ЛДГ_{обр} увеличивалась на 101±9% и 297±3% соответственно по сравнению с контролем. Чистый **ДФБ** в той же дозе увеличивал активность ЛДГ_{обр} на 54±4%, тогда как активность ЛДГ_{пр} не зависела от влияния **ДФБ** по сравнению с контролем.

Активности ЛДГ_{пр} и ЛДГ_{обр} изменялись незначительно при использовании комбинированного препарата **ДФБ+5-ФУ**, тогда как в дозе 2 мкг/мл активности ЛДГ_{пр} и ЛДГ_{обр} были выше контрольной группы на 23% и 195%, соответственно.

Таким образом, комбинированные лекарственные препараты **ДФБ** с **ГС** и **5-ФУ** главным образом влияют на активность ЛДГ_{обр}, наиболее сильно это проявляется в случае комбинированного препарата **ДФБ** с гидразина сульфатом.

Рост активности ЛДГ_{обр} характеризует увеличение содержания молочной кислоты, которая образуется в основном М-субъединицами ЛДГ (ЛДГ_{обр}) и указывает на преобладание анаэробных процессов в эритроцитах.

Эти результаты, вероятно, связаны с эффектом Пастера, который сочетает в себе процессы гликолиза и дыхания, что особенно важно для опухолевых клеток [143]. Гликолитические ферменты и митохондриальные системы раковых клеток не отличаются от нормальных, однако способы сочетания процессов гликолиза и дыхания в нормальных и опухолевых клетках, очевидно, различны. Именно поэтому опухолевые клетки, в отличие от нормальных клеток в дыхательных процессах, накапливают значительное количество лактата даже при полной оксигенации и высокой скорости дыхания. Одной из причин избытка лактата является дефицит цитоплазматической глицерофосфатдегидрогеназы в опухолевых клетках, поэтому челночный механизм глицерофосфата не может действовать эффективно.

Таблица 5.3

Активность лактатдегидрогеназы (% от контроля) в прямой и обратной реакциях под действием **5-ФУ**, **ГС**, **ДФБ**, **ДФБ+5-ФУ** и **ДФБ+ГС** в дозах 2, 5 и 10 мкг/мл

	Доза, мкг/мл	Активность, % от контроля	
		ЛДГ _{пр}	ЛДГ _{обр}
ДФБ	2	99 ±7	154 ±4
	5	130 ±3	98 ±21
	10	134 ±15	71 ±3
5-ФУ	2	124 ±8	201 ±9
	5	102 ±16	85 ±5
	10	115 ±4	163 ±3
ДФБ+5-ФУ	2	100 ±9	106 ±5
	5	102 ±10	112 ±11
	10	131 ±11	105 ±4
ГС	2	124 ±10	397 ±3
	5	136 ±8	97 ±13
	10	164 ±6	134 ±5
ДФБ+ГС	2	123 ±3	295 ±21
	5	132 ±2	158 ±3
	10	148 ±1	227 ±3

^a Число повторов измерений составляло 3 раза.

Поскольку опухолевые клетки не способны окислять НАДН митохондриальным путем, они повторно окисляют НАДН, используя пируват лактатдегидрогеназой; в этом случае лактат накапливается в аэробных условиях, хотя цикл трикарбоновой кислоты и цепь переноса электронов имеют нормальную скорость биохимических реакций, характерных для аэробных состояний в опухолевых клетках. Соответственно, сдвиг в сторону обратной реакции благоприятствует опухолевым клеткам.

Есть много дискуссий об эффекте Варбурга. В настоящее время установлено, что энергетический обмен опухолевых клеток определяется балансом между гликолизом и окислительным фосфорилированием, тогда как влияние «чистого гемолиза» Варбурга в опухолевых клетках оспаривается [145-148]. Способность лекарств активировать энергетический метаболизм в опухолевых клетках как гликолиз, так и окислительное фосфорилирование (увеличение активности ЛДГ_{пр}

и ЛДГ_{обр}) можно объяснить только как эффективность исследуемых препаратов для выживаемости.

Мы считаем, что метаболическая пластичность, наблюдаемая под действием **ДФБ+ГС** *in vitro* с использованием эритроцитов здоровых крыс, может влиять на физиологию опухоли *in vivo*. Поэтому эти эффекты могут использоваться в качестве элементов метаболической терапии.

Аргументом в пользу эффективности действия комбинированных препаратов **ДФБ** является высокая антиоксидантная активность **ДФБ**, выявленная нами в разделе 5.1.

Увеличение активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы связано с активацией генов, кодирующих семейство цитопротекторных белков. Поскольку окислительное повреждение клеток играет важную роль в механизме канцерогенеза, данные о высокой антиоксидантной ферментной защите, полученные в этой работе, являются хорошим показателем противоопухолевой активности этих комбинированных препаратов.

Влияние **ДФБ** на противоопухолевый эффект может быть объяснено рядом причин. Во-первых, **ДФБ**, близкий по структуре к бетулиновой кислоте, имеет лучшую растворимость (растворимость **ДФБ** 0,1 г/л по сравнению с растворимостью бетулиновой кислоты 0,0001 г/л), и, соответственно, более высокую биодоступность. Во-вторых, синергизм противоопухолевого действия **ДФБ** с **ГС** и **5-ФУ** может быть объяснен свойствами фосфатсодержащих молекул бетулина, способных взаимодействовать с аминами, аминокислотами, амино- и NH-группами белков как с образованием ковалентных, так и водородных связей, а также в виде комплексообразования. Можно предположить, что связывание **ДФБ** с азотсодержащими **5-ФУ** и **ГС**, позволит сократить большие дозы токсичных ЛВ, а сродство фосфатных групп к аминам позволит **ДФБ** выполнить функции агента доставки.

Дозозависимые эффекты исследуемых лекарств можно объяснить, учитывая их окислительно-восстановительный потенциал. **5-ФУ** и **ГС** имеют различный

антиоксидантный потенциал, который наиболее полно отражается в дозе 2 мкг. ГС имеет наиболее оптимальный окислительно-восстановительный потенциал по сравнению с **5-ФУ** и обладает более сильными антиоксидантными свойствами как в водных, так и в липидных средах. В более высоких дозах биологически активные вещества, обладающие большей антиоксидантной активностью, такие как аскорбиновая кислота и фенолы, имеют тенденцию к увеличению прооксидантного эффекта. Этот прооксидантный эффект ГС и **5-ФУ** проявлялся в сочетании с ДФБ, что и отражается в увеличении уровня МДА в комбинациях ГС+ДФБ и **5-ФУ**+ДФБ в дозах 5 и 10 мкг. Резкое снижение уровня МДА, вероятно, связано с ролью димеров ДФБ или тетрамеров в качестве вектора доставки лекарств токсичных ГС и **5-ФУ** путем образования комплекса включения «ДФБ+ЛВ» в низкой дозе, тогда как часть ГС не участвует в включении комплексов «ДФБ+ГС» при высоких дозах препарата. Раннее образование комплексов ДФБ с другими аминами - трисамином и допамином было показано термодинамическими методами.

Выводы по главе 5

3,28-дифосфат бетулина проявляет синергетический эффект в комбинации с 5-фторурацилом и гидразина сульфатом. Действие комбинированных препаратов, вероятно, усиливается за счет влияния на окислительный стресс и энергетический обмен. Активность редокс-ферментов – супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы, каталазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, существенно увеличивалось по сравнению с контролем. Комбинация ДФБ+ГС способствовала увеличению активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в обратной реакции на $195 \pm 21\%$ по сравнению с контролем.

ДФБ в сочетании с ГС и **5-ФУ** улучшал состояние здоровья животных, а также уменьшал дозу ГС и **5-ФУ** при лечении асцитной карциномы Эрлиха, что может быть использовано при паллиативной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований получены и изучены водорастворимая натриевая соль и солевые комплексы 3,28-дифосфата бетулина с трисамином, ксимедоном и меглумином с улучшенной гидрофильностью.

Предлагается использовать натриевую соль ДФБ как потенциальную фармацевтическую субстанцию.

ВЫВОДЫ

1. Впервые исследована водорастворимая натриевая соль 3,28-дифосфата бетулина и разработаны условия ее получения в устойчивой полиморфной модификации в виде игольчатых кристаллов.

2. Показано влияние структуры исходного 3,28-дифосфата бетулина на процесс получения натриевой соли. Впервые выявлены две основные структурные модификации 3,28-дифосфата бетулина, различающиеся по температуре плавления, растворимости, ИК-спектрам и по величинам экзо-эффекта при $193 \pm 8^\circ\text{C}$ ($-19,7 \pm 0,2$ кДж/моль и $-70,5 \pm 0,7$ кДж/моль, соответственно).

3. Разработаны методики идентификации и количественного определения натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина и проведена ее стандартизация. Подлинность установлена данными ИК-, УФ-, ^{13}C - и ^{31}P -ЯМР спектров, температуры эндо-эффекта на ДСК-кривых и рентгеновской порошковой дифрактометрии. Оценка погрешностей и неопределенности количественного определения действующего вещества показала приемлемость использования методов ВЭЖХ и анализа общего фосфора.

4. Впервые получен солевой комплекс 3,28-дифосфата бетулина с трисамином состава 1:1, установленного методами Остромысленского-Жоба и молярных отношений, и рассчитана его кажущаяся константа устойчивости, равная 1130 л/моль.

5. Методами УФ, ИК и ^{31}P -ЯМР спектроскопии исследовано комплексообразование 3,28-дифосфата бетулина с меглумином и ксимедоном в

воде. Показано улучшение растворимости в воде комплексов 3,28-дифосфата бетулина с меглумином до 59 г/л, что практически в 600 раз превышает растворимость в воде исходного 3,28-дифосфата бетулина.

6. В экспериментах *in vitro* на крови крыс установлено ингибирование процессов перекисного окисления липидов, увеличение активности супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы, каталазы, 6-фосфатдегидрогеназы, а также улучшение энергетического метаболизма в клетке под действием натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина и его комплексных соединений с меглумином по сравнению с контролем.

7. Было показано снижение дозы токсичных противоопухолевых препаратов 5-фторурацила и гидразина сульфата и повышение их эффективности в комбинации с 3,28-дифосфатом бетулина при лечении привитой асцитной карциномы Эрлиха у мышей. ДФБ в сочетании с 5-ФУ и ГС улучшал состояние здоровья животных и их выживаемость на 40-70%, снизил объем асцитической жидкости на 50%, а также уменьшал дозу 5-ФУ и ГС при лечении привитой асцитной карциномы Эрлиха, что может быть использовано при паллиативной терапии.

РЕКОМЕНДАЦИИ

Данные, полученные в результате проведенных исследований, имеют практическую значимость при поиске новых отечественных лекарственных средств на основе производных бетулина.

Рекомендуется:

- использовать впервые полученную натриевую соль и солевые комплексы 3,28-дифосфата бетулина в качестве компонента новых лекарственных средств, используемых в паллиативной медицине при лечении онкологических заболеваний;

- внедрить разработанные методики получения и анализа натриевую соль и солевые комплексы 3,28-дифосфата бетулина в учебный процесс по фармацевтической химии и научно-исследовательскую работу вузов.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в дальнейшем направленном поиске и создании новых высокоэффективных биологически активных соединений на основе производных бетулина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang, D.-M. Betulinic Acid and its Derivatives as Potential Antitumor Agents / D.-M. Zhang, H.-G. Xu, L. Wang, Y.-J. Li, P.-H. Sun, X.-M. Wu, G.-J. Wang, W.-M. Chen, W.-C. Ye // *Medicinal Research Reviews* – 2015. – Vol.35, №6. – P. 1127-1155.
2. Chudzik, M. Triterpenes as Potentially Cytotoxic Compounds / M. Chudzik, I. Korzonek-Szlacheta, W. Król // *Molecules* – 2015, Vol.20, №1. – P. 1610-1625.
3. Damle, A.A. Anticancer activity of betulinic acid on MCF-7 tumors in nude mice / A.A. Damle, Y.P. Pawar, A.A. Narkar // *Indian Journal of Experimental Biology* – 2013. Vol.51, №7. – P. 485-491.
4. Spivak, A. Synthesis and Evaluation of Anticancer Activities of Novel C-28 Guanidine-Functionalized Triterpene Acid Derivatives / A. Spivak, R. Khalitova, D. Nedopekina, L. Dzhemileva, M. Yunusbaeva, V. Odinokov, V. D'yakonov, U. Dzhemilev // *Molecules* – 2018. – Vol.23, №11. – P. 3000.
5. Woz'niak, Ł. Ursolic Acid—A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities / Ł. Woz'niak, S. Ska'pska, K. Marszałek // *Molecules* – 2015 – Vol.20, №11. – P. 20614-20641.
6. Kahnt, M. Ethylenediamine Derived Carboxamides of Betulinic and Ursolic Acid as Potential Cytotoxic Agents / M. Kahnt, L. Fischer, A. Al-Harrasi, R. Csuk // *Molecules* – 2018. – Vol.23, №10. – P. 2558.
7. Drąg-Zalesińska, M. Anticancer properties of ester derivatives of betulin in human metastatic melanoma cells (Me-45) / M. Drąg-Zalesińska, M. Drąg, M. Poręba, S. Borska, J. Kulbacka, J. Saczko // *Cancer Cell International* – 2017. – Vol.17. – P. 4.
8. Sidova, V. Cytotoxic conjugates of betulinic acid and substituted triazoles prepared by Huisgen Cycloaddition from 30-azidoderivatives / V. Sidova, P. Zoufaly, J. Pokorny, P. Dzubak, M. Hajduch, I. Popa, M. Urba // *PLoS ONE* – 2017. – Vol.12, №2. – P. 1-25.

9. Król, S.K. Comprehensive Review on Betulin as a Potent Anticancer Agent / S.K. Król, M. Kielbus, A. Rivero-Müller, A. Stepulak // *BioMed Research International* – 2015. – P. 1-11.
10. Hordyjewska, A. Betulin and betulinic acid in cancer research / A. Hordyjewska, A. Ostapiuk, A. Horecka // *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* – 2018. – Vol.2, №12. – P. 72-75.
11. Boryczka, S. Synthesis, Structure and Cytotoxic Activity of New Acetylenic Derivatives of Betulin / S. Boryczka, E. Bębenek, J. Wietrzyk, K. Kempieńska, M. Jastrzębska, J. Kusz, M. Nowak // *Molecules* – 2013. – Vol. 18, № 4. – P. 4526-4543.
12. Selim, Y.A. Cytotoxic and antimicrobial activities of two new triterpenoids from the peels of local Egyptian *Malus domestica* L. / Y.A. Selim, K.E. Litinas // *Medicinal Chemistry Research* – 2015. – Vol.24, №.12. – P. 4016–4022.
13. Saeed, M.E.M. Betulinic Acid Exerts Cytotoxic Activity Against Multidrug-Resistant Tumor Cells via Targeting Autocrine Motility Factor Receptor (AMFR) / M.E.M. Saeed, N. Mahmoud, Y. Sugimoto, T. Efferth, H. Abdel-Aziz // *Frontiers in Pharmacology* – 2018. – Vol.9, 481. – P. 1-13.
14. Liebscher, G. In vitro anticancer activity of Betulinic acid and derivatives thereof on equine melanoma cell lines from grey horses and in vivo safety assessment of the compound NVX-207 in two horses / G. Liebscher, K. Vanchangiri, T. Mueller, K. Feige, J.M. Cavalleri, R. Paschke // *Chemico-Biological Interactions* – 2016. – Vol.246. – P. 20-29.
15. Абышев, А.З. Производные бетуленола как перспективные анти-ВИЧ агенты / А.З. Абышев, Р.А. Абышев, В.Х. Нгуен, В.А. Морозова // *Медицинский академический журнал* – 2013. – Том 13, №2. – С. 15-31.
16. Periasamy, G. Betulinic acid and its derivatives as anti-cancer agent: A review / G. Periasamy, G. Teketelew, M. Gebrelibanos, B. Sintayehu, M. Gebrehiwot, A. Karim, G. Geremedhin // *Archives of Applied Science Research* – 2014. – Vol.6, №3. – P. 47-58.

17. Chrobak, E. Betulin phosphonates; Synthesis, structure, and cytotoxic activity / E. Chrobak, E. Bebenek, M. Kadela-Tomanek, M. Latocha, Ch. Jelsch, E. Wenger, S. Boryczka // *Molecules* – 2016. – Vol.21, №9. – P. 1123-1126.
18. Zhao, J. Antitumor Activity of Betulinic Acid and Betulin in Canine Cancer Cell Lines / J. Zhao, R. Li, A. Pawlak, M. Henklewska, A. Sysak, L. Wen, J.-E. Yi, B. Obmińska-Mrukowicz // *In Vivo* – 2018. – Vol.32, №5 – P. 1081-1088.
19. Pradere, U. Synthesis of nucleoside phosphate and phosphonate prodrugs / U. Pradere, E.C. Garnier-Amblard, S.J. Coats, F. Amblard, R.F. Schinazi // *Chemical Reviews* – 2014. – Vol. 114, №18. – P. 9154-9218.
20. Feng, J.-h. Involvement of protein kinase C - δ activation in betulin-induced apoptosis of neuroblastoma / J.-h. Feng, X.-z. Duan, J.-y. Pan, W.-m. Li, X.-d. Zhang, Y.-s. Zhang // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* – 2017. – Vol.16, №9 – P. 2097-2105.
21. Lee, S.Y. Recent studies on betulinic acid and its biological and pharmacological activity / S.Y. Lee, H.H. Kim, S.U. Park // *Experimental and Clinical Sciences* – 2015. – Vol.14. – P. 199-203.
22. Wang, Y.-J. Sequential treatment with betulinic acid followed by 5-fluorouracil shows synergistic cytotoxic activity in ovarian cancer cells / Y.-J. Wang, J.-B. Liu, Y.-C. Dou // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* – 2015. – Vol.8, №1. – P. 252-259.
23. Boparai, A. Betulin a pentacyclic triterpenoid: an hour to rethink the compound / A. Boparai, J. Niazi, N. Bajwa, P.A. Singh // *Journal of Translational Medicine* – 2017. – Vol.1, №2. – P. 53-59.
24. Yi, J. Betulinic acid prevents alcohol-induced liver damage by improving the antioxidant system in mice / J. Yi, W. Xia, J. Wu, L. Yuan, J. Wu, D. Tu, J. Fang, Zh. Tan // *Journal of Veterinary Science* – 2014. – Vol.15, №1. – P. 141-148.
25. Xu, T. Betulinic acid induces apoptosis by regulating PI3K/Akt signaling and mitochondrial pathways in human cervical cancer cells / T. Xu, Q. Pang, Y. Wang, X. Yan // *International journal of molecular medicine* – 2017. – Vol.40, №6. – P. 1669–1678.

26. Cháirez-Ramírez, M.H. Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: a review / M.H. Cháirez-Ramírez, M.R. Moreno-Jiménez, R.F. González-Laredo, J.A. Gallegos-Infante, N.E. Rocha-Guzmán // *Experimental and Clinical Sciences* – 2016. – Vol.15. – P. 758-771.

27. Zhou, Z. Betulin induces cytochrome c release and apoptosis in colon cancer cells via NOXA / Z. Zhou, C. Zhu, Z. Cai, F. Zhao, L. He, X. Lou, X. Qi // *Oncology letters* – 2018. – Vol.15, №5. – P. 7319-7327.

28. Alqahtani, A. The pentacyclic triterpenoids in herbal medicines and their pharmacological activities in diabetes and diabetic complications / A. Alqahtani, K. Hamid, A. Kam, K.H. Wong, Z. Abdelhak, V. Razmovski-Naumovski, K. Chan, K.M. Li, P.W. Groundwater, G.Q. Li // *Current Medicinal Chemistry* – 2013. – Vol.20, №7. – P. 908-931.

29. So, H.M. Bioactivity evaluations of betulin identified from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica* for cancer therapy / H.M. So, H.J. Eom, D. Lee, S. Kim, K.S. Kang, I.K. Lee, K.H. Baek, J.Y. Park, K.H. Kim // *Archives of Pharmacal Research* – 2018. – Vol.41, №8. – P. 815-822.

30. Bebenek, E. Novel Triazole Hybrids of Betulin: Synthesis and Biological Activity Profile / E. Bebenek, M. Jastrzebska, M. Kadela-Tomanek, E. Chrobak, B. Orzechowska, K. Zwolinska, M. Latocha, A. Mertas, Z. Czuba, S. Boryczk // *Molecules* – 2017. - Vol.22, №11. – P. 1876-1892.

31. Härmä, V. Optimization of Invasion-Specific Effects of Betulin Derivatives on Prostate Cancer Cells through Lead Development / V. Härmä, R. Haavikko, J. Virtanen, I. Ahonen, H.-P. Schukov, S. Alakurtti, E. Purev, H. Rischer, J. Yli-Kauhaluoma, V.M. Moreira, M. Nees, K.M. Oksman-Caldentey // *PLoS ONE* – 2015. – Vol.10, №5. – P. 1-22.

32. Yu, H. Combination of betulinic acid and chidamide synergistically inhibits Epstein-Barr virus replication through over-generation of reactive oxygen species / Yu H., H. Zhang, Z. Chu, Q. Ruan, X. Chen, D. Kong, X. Huang, H. Li, H. Tang, H. Wu, Y. Wang, W. Xie, Y. Ding, P. Yao // *Oncotarget* – 2017. – Vol.8, №37. – P. 61646–61661.

33. Haque, S. Screening and Characterisation of Antimicrobial Properties of Semisynthetic Betulin Derivatives / S. Haque, D.A. Nawrot, S. Alakurtti, L. Ghentio, J. Yli-Kauhaluoma, P. Tammela // *PLoS ONE* – 2014. – Vol.9, №7. – P. e102696.
34. Huang, Q-x. Structure and Anti-HIV Activity of Betulinic Acid Analogues / Q-x. Huang, H.-f. Chen, X.-r. Luo, Y.-x. Zhang, X. Yao, X. Zheng // *Current Medical Science* – 2018. – Vol.38, №3. – P. 387-397.
35. Visalli, R.J. Ionic Derivatives of Betulinic Acid Exhibit Strong Antiviral Activity Against Herpes Simplex Virus Type-2 (HSV-2), But Not HIV-1 Reverse Transcriptase / R.J. Visalli, H. Ziobrowski, K.R. Badri, J.J. He, X. Zhang, S.R. Arumugam, H. Zhao // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* – 2015. – Vol.25, №16. – P. 3168–3171.
36. Paduch, R. Antitumor and Antiviral Activity of Pentacyclic Triterpenes / R. Paduch, M. Kandefer-Szerszeń // *Mini-Reviews in Organic Chemistry* – 2014. – Vol.11, №3. – P. 262-268.
37. Moghaddam M.G. Biological Activity of Betulinic Acid: A Review / M.G. Moghaddam, F.B.H. Ahmad, A. Samzadeh-Kermani // *Pharmacology & Pharmacy* – 2012. – Vol.3, №12. – P. 119-123.
38. Dang, Z. New Betulinic Acid Derivatives for Bevirimat-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type-1 / Z. Dang, P. Ho, L. Zhu, K. Qian, K.-H. Lee, L. Huang, C.-H. Chen // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2013. – Vol.56, №5. – P. 2029-37.
39. Csuk, R. Betulinic acid and its derivatives: a patent review (2008-2013) / R. Csuk // *Expert Opinion on Therapeutic Patents* – 2014. – Vol.24, №8. – P. 913-923.
40. Yadav, V.A.K. In vitro anthelmintic assessment of selected phytochemicals against *Hymenolepis diminuta*, a zoonotic tapeworm / V.A.K. Yadav // *Journal of parasitic diseases* – 2016. – Vol.40, №3. – P. 1082-1086.
41. Oyebanji, B.O. Studies on the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of betulinic acid derived from *Tetracera potatoria* / B.O. Oyebanji, A.B. Saba, O.A. Oridupa // *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines* – 2014. – Vol.11, №1. – P. 30-33.

42. Zou, L.-W. Structure-Activity Relationships of Pentacyclic Triterpenoids as Potent and Selective Inhibitors against Human Carboxylesterase 1 / L.-W. Zou, T.-Y. Dou, P. Wang, W. Lei, Z.-M. Weng, J. Hou, D.-D. Wang, Y.-M. Fan, W.-D. Zhang, G.-B. Ge, L. Yang // *Frontiers in Pharmacology* – 2017. – Vol.8, 435. – P. 1-12.
43. Furtado, N.A. Pentacyclic Triterpene Bioavailability: An Overview of In Vitro and In Vivo Studies / N.A. Furtado, L. Pirson, H. Edelberg, L.M. Miranda, C. Loira-Pastoriza, V. Preat, Y. Larondelle, C.M. André // *Molecules* – 2017. – Vol.22, №3. – P. 400, 1-24.
44. Meng, Q. Research Progress in the Promising Natural Product-Betulin / Meng Q., Zhou X., Liu L., Fu S. // *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research* – 2018. – Vol.8, №2. – P. 1-6.
45. Li, Y. Betulin induces reactive oxygen species-dependent apoptosis in human gastric cancer SGC7901 cells Jin / Y. Li, X. Liu, D. Jiang, Y. Lin, Y. Wang, Q. Li, L. Liu, Y. Hua // *Archives of Pharmacal Research* – 2016. – Vol.39, №9. – P. 1257-1265.
46. Oloyede, H.O.B. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid / H.O.B. Oloyede, H.O. Ajiboye, M.O. Salawu, T.O. Ajiboye // *Microbial Pathogenesis* – 2017. – Vol.111. – P. 338-344.
47. Kim, K.-J. Betulin Suppresses Osteoclast Formation via Down-Regulating NFATc1 / K.-J. Kim, Y. Lee, H.-G. Hwang, S.H. Sung, M. Lee, Y.-J. Son // *Journal of Clinical Medicine* – 2018. – Vol.7, №6. – P. 1-11.
48. Siddiqui, S.A. A novel triterpenoid 16-hydroxy betulinic acid isolated from *Mikania cordata* attributes multi-faced pharmacological activities / S.A. Siddiqui, A. Rahman, M.O. Rahman, M.A. Akbar, M.A. Ali, F.M.A. Al-Hemaid, M.S. Elshikh, M.A. Farah // *Saudi Journal of Biological Sciences* – 2018. – In press. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.03.002>.
49. Ekuadzi, E. Antiinflammatory properties of betulinic acid and xylopic acid in the carrageenan-induced pleurisy model of lung inflammation in mice / E. Ekuadzi, R.P. Biney, C.K. Benneh, B.O. Amankwaa, J. Jato // *Phytotherapy Research* – 2017. – Vol.32, №3, - P. 480-487.

50. Laavola, M. Betulin Derivatives Effectively Suppress Inflammation in Vitro and in Vivo / M. Laavola, R. Haavikko, M. Hamalainen, T. Leppanen, R. Nieminen, S. Alakurtti, V.M. Moreira, J. Yli-Kauhaluoma, E. Moilanen // *Journal of Natural Products* – 2015. – Vol.79, №2. – P. 274-280.
51. Ekuadzi, E. Antiinflammatory properties of betulinic acid and xylopic acid in the carrageenan - induced pleurisy model of lung inflammation in mice / E. Ekuadzi, R.P. Biney, C.K. Benneh, B. Osei Amankwaa, J. Jato // *Phytotherapy Research* – 2018. – Vol.32, №3. – P. 480-487.
52. Innocente, A.M. Synthesis and Antiplasmodial Activity of Betulinic Acid and Ursolic Acid Analogues / A.M. Innocente, G.N.S. Silva, L.N. Cruz, M.S. Moraes, M. Nakabashi, P. Sonnet, G. Gosmann, C.R.S. Garcia, S.C.B. Gnoatto // *Molecules* – 2012. – Vol.17, №10. – P. 12003-12014.
53. Khan, M.F. Computational investigations of physicochemical, pharmacokinetic, toxicological properties and molecular docking of betulinic acid, a constituent of *Corypha taliera* (Roxb.) with Phospholipase A2 (PLA2) / M.F. Khan, N. Nahar, R.B. Rashid, A. Chowdhury, M.A. Rashid // *BMC Complementary and Alternative Medicine* – 2018. – Vol.18, №1. – P. 1-15.
54. Babalola, I.T. Platelet-Aggregation Inhibitory Activity of Oleanolic Acid, Ursolic Acid, Betulinic Acid, and Maslinic Acid / I.T. Babalola, F.O. Shode, E. Adelokun, A.R. Opoku, R.A. Mosa // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* – 2013. – Vol.6, №1. – P. 54-60.
55. Habila, A.J. Inhibitory effect of betulinic acid and 3 β -acetoxybetulinic acid on rat platelet aggregation / A.J. Habila, J.D. Habila, F.O. Shode, A.R. Opoku, S.E. Atawodi, I.A. Umar // *African Journal of. Pharmacy and Pharmacology* – 2013. – Vol.7, №43. – P. 2881-2886.
56. Osunsanmi, F.O. Antithrombotic, anticoagulant and antiplatelet activity of betulinic acid and 3 β -acetoxybetulinic acid from *Melaleuca bracteata* 'Revolution Gold' (Myrtaceae) Muell leaf / F.O. Osunsanmi, G.E. Zaharare, B.E. Oyinloye, R.A. Mosa, M.I. Ikhile, F.O. Shode, I.B. Ogunyinka, A.R. Opoku // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* – 2018. – Vol.17, №10. – P. 1983-1989.

57. Schwieger-Briel, A. Betulin-Based Oleogel to Improve Wound Healing in Dystrophic Epidermolysis Bullosa: A Prospective Controlled Proof-of-Concept Study / A. Schwieger-Briel, D. Kiritsi, C. Schempp, C. Has, H. Schumann // *Dermatology Research and Practice* – 2017. – P. 1-10.
58. Dehaen, W. Allobetulin and Its Derivatives: Synthesis and Biological Activity / W. Dehaen, A.A. Mashentseva, T.S. Seitembetov // *Molecules* – 2011. – Vol.16, №3. – P. 2443-2466.
59. Wang, X. Studies on Solvatomorphism of Betulinic Acid / X. Wang, N. Gong, S. Yang, G. Du, Y. Lu // *Journal of Pharmaceutical Sciences* – 2014. – Vol.103, №9. – P. 2696-2703.
60. Drebuschak, V.A. Melting of orthorhombic betulin / V.A. Drebuschak, M.A. Mikhailenko, T.P. Shakhtshneider, S.A. Kuznetsova // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* – 2013. – Vol.111, №3/ - P. 2005-2008.
61. Cheng, Y. Solubilities of Betulinic Acid in Thirteen Organic Solvents at Different Temperatures / Y. Cheng, Y. Shao, W. Yan // *Journal of Chemical & Engineering Data* – 2011. – Vol.56, №12. – P. 4587-4591.
62. Boryczka, S. X-Ray Crystal Structure of Betulin–DMSO Solvate / S. Boryczka, E. Michalik, M. Jastrzebska, J. Kusz, M. Zubko, E. Bębenek // *Journal of Chemical Crystallography* – 2011. – Vol.42, №4. – P. 345-351.
63. Boryczka, S. X-Ray Diffraction and Infrared Spectroscopy of N,N-Dimethylformamide and Dimethyl Sulfoxide Solvatomorphs of Betulinic Acid / S. Boryczka, M. Jastrzebska, E. Bębenek, J. Kusz, M. Zubko, M. Kadela, E. Michalik // *Journal of Pharmaceutical Sciences* – 2012. – Vol.101, №12. – P. 4458-4471.
64. Yang, D. Isostructurality Among 5 Solvatomorphs of Betulin: X-Ray Structure and Characterization / D. Yang, N. Gong, L. Zhang, Y. Lu // *Journal of Pharmaceutical Sciences* – 2016. – Vol.105, №6. – P. 1867-1873.
65. Tang, W. Crystal structure of betulinic acid methanol monosolvate / W. Tang, N.-H. Chen, G.-Q. Li, G.-C. Wang, Y.-L. Li // *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online* – 2014. – Vol.70, №12. – P. 1242-1243.

66. Lancaster, R.W. Fifty-year old samples of progesterone demonstrate the complex role of synthetic impurities in stabilizing a metastable polymorph / R.W. Lancaster, L.D. Harris, D. Pearson // *CrystEngComm* – 2011. – Vol.13. – P. 1775-1777.
67. Buckley, S.T. In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives / S.T. Buckley, S.M. Fischer, G. Fricker, M. Brandl // *European Journal of Pharmaceutical Sciences* – 2012. – Vol.45, №3. – P. 235-250.
68. Benet, L.Z. BDDCS, the rule of 5 and drugability / L.Z. Benet, C.M. Hosey, O. Ursu, T.I. Oprea // *Advanced Drug Delivery Reviews* – 2016. – Vol. 101. – P. 89-98.
69. Mullauer, F.B. Betulinic acid delivered in liposomes reduces growth of human lung and colon cancers in mice without causing systemic toxicity / F.B. Mullauer, L. van Bloois, J.B. Daalhuisen, M.S. Ten Brink, G. Storm, J.P. Medema, R.M. Schiffelers, J.H. Kessler // *Anticancer Drugs* – 2011. – Vol.22, №3. – P. 223-233.
70. Halder, A. Lactoferrin-modified Betulinic Acid-loaded PLGA nanoparticles are strong anti-leishmanials / A. Halder, D. Shukla, S. Das, P. Roy, A. Mukherjee, B. Saha // *Cytokine* – 2018. – Vol.110. – P. 412-415.
71. Lomkova, E.A. Biodegradable Micellar HPMA-Based Polymer–Drug Conjugates with Betulinic Acid for Passive Tumor Targeting / E.A. Lomkova, P. Chytil, O. Janoušková, T. Mueller, H. Lucas, S.K. Filippov, O. Trhlíková, P.A. Aleshunin, Y.A. Skorik, K. Ulbrich, T. Etrych // *Biomacromolecules* – 2016. – Vol.17, №11. – P. 3493-3507.
72. Filippov, S.K. Influence of molar mass, dispersity, and type and location of hydrophobic side chain moieties on the critical micellar concentration and stability of amphiphilic HPMA-based polymer drug carriers / S.K. Filippov, N.S. Vishnevetskaya, B.-J. Niebuur, E. Koziolová, E.A. Lomkova, P. Chytil, T. Etrych, C.M. Papadakis // *Colloid and Polymer Science* – 2017. – Vol.295, №8 – P. 1313-1325.
73. Маляр, Ю.Н. Получение композитов диацетата и дипропионата бетулина с аэросилом / Ю.Н. Маляр, С.А. Кузнецова, Т.П. Шахтшнейдер, М.А. Михайленко // *Journal of Siberian Federal University. Chemistry* – 2015. – Том 2, С. 277-286.

74. Попова, О.В. Определение констант устойчивости комплексов включения производных бетулина с β -циклодекстрином методом капиллярного электрофореза / О.В. Попова, В.В. Сурсякова, Г.В. Бурмакина, В.А. Левданский, А.И. Рубайло // Доклады Академии Наук – 2015, Том 461, No.1. – С. 41–43.
75. Falamaş, A. Spectroscopic investigations of newly formed betulin-cyclodextrin guest-host type complexes as potential anti skin cancer candidates / A. Falamaş, S.C. Pînzaru, V. Chiş, C. Dehelean // Journal of Molecular Structure – 2011. – Vol.993, №1-3. – P. 297-301.
76. Şoica, C. Betulin Complex in γ -Cyclodextrin Derivatives: Properties and Antineoplastic Activities in In Vitro and In Vivo Tumor Models / C. Şoica, C. Dehelean, C. Danciu, H. Wang, G. Wenz, R. Ambrus, F. Bojin, M. Anghel // International Journal of Molecular Sciences – 2012. – Vol.13, №12. – P. 14992-15011.
77. Wang, H.M. A Comparison Investigation on the Solubilization of Betulin and Betulinic Acid in Cyclodextrin Derivatives / H.M. Wang, C. Soica, G. Wenz // Natural product communications – 2012. – Vol.7, №3. – P. 289-291.
78. Dehelean, C.A. A pharmaco-toxicological evaluation of betulinic acid mixed with hydroxipropilgamma cyclodextrin on in vitro and in vivo models / C.A. Dehelean, C. Soica, C. Peev, S. Ciurlea, S. Feflea, P. Kasa // Farmacia – 2009. – Vol.59, №1. – P. 51-59.
79. Михайленко, М.А. Влияние механической обработки на свойства бетулина, диацетата бетулина и их смеси с водорастворимыми полимерами / М.А. Михайленко, Т.П. Шахтшнейдер, В.А. Дребущак, С.А. Кузнецова, Г.П. Скворцова, В.В. Болдырев // Химия природных соединений – 2011. – Том. 2. – С. 211-214.
80. Dai, L. Water soluble multiarm-polyethylene glycol-betulinic acid prodrugs: design, synthesis, and in vivo effectiveness / L. Dai, D. Li, J. Cheng, J. Liu, L.-H. Deng, L.-Y. Wang, J.-D. Lei, J. He // Polymer Chemistry – 2014. – Vol.5. – P. 5775-5783.
81. Mikhailenko, M.A. Supramolecular architecture of betulin diacetate complexes with arabinogalactan from *Larix sibirica* / M.A. Mikhailenko, T.P. Shakhshneider, I.V. Eltsov, A.S. Kozlov, S.A. Kuznetsova, A.A. Karacharov, V.V. Boldyrev // Carbohydrate Polymers – 2016. – Vol.138. – P. 1-7.

82. Горбунова, М.Н. Тримерпенсодержащие полимерные конструкции: синтез и биологическая активность / М.Н. Горбунова, Г.Ф. Крайнова // Вестник пермского научного центра УРО РАН – 2014. – Том 2. – С. 44-51.
83. Zawilska, J.B. Prodrugs: A challenge for the drug development / J.B. Zawilska, J. Wojcieszak, A.B. Olejniczak // Pharmacological Reports – 2013. – Vol.65, №1. – P. 1-14.
84. Jonnalagadda, S.C. Chapter 2 - Recent Developments on the Synthesis and Applications of Betulin and Betulinic Acid Derivatives as Therapeutic Agents Studies / S.C. Jonnalagadda, P. Suman, D.C. Morgan, J.N. Seay // In Natural Products Chemistry – 2017. – Vol.53. – P. 45-84.
85. Drag-Zalesinska, M. Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells / M. Drag-Zalesinska, J. Kulbacka, J. Saczko, T. Wysocka, M. Zabel, P. Surowiak, M. Drag // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters – 2009. – Vol.19, №16. – P. 4814-4817.
86. Tubek, B. Synthesis of 28-O-(1,2-Diacetyl-SN-glycero-3-phospho)-betulin / B. Tubek, D. Smuga, M. Smuga, C. Wawrzeńczyk // Synthetic Communications – 2012. – Vol.42. – P. 3648-3654.
87. Tubek, B. Synthesis and Cytotoxic Activity of New Betulin and Betulinic Acid Esters with Conjugated Linoleic Acid (CLA) / B. Tubek, P. Mituła, N. Niezgod, K. Kempnińska, J. Wietrzyk, C. Wawrzeńczyk // Natural product communications – 2013. – Vol.8, №4. – P. 435-438.
88. Thibeault, D. Synthesis and cytotoxicity of lupane-type triterpenoid glyceryl esters / D. Thibeault, C. Gauthier, J. Legault, J. Bouchard, L. Gagné, A. Pichette // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters – 2012. – Vol.22, №14. – P. 4735-4739.
89. Левданский, В.А. Сульфатирование бетулина хлорсульфоновой кислотой в диоксане и диметилформамиде / В.А. Левданский, А.В. Левданский, Б.Н. Кузнецов // Химия растительного сырья – 2013. - Том 1. – С. 107-111.
90. Левданский, В.А. Синтез 3-сульфата бетулиновой кислоты сульфатированием в среде диоксана и диметилформамида / В.А. Левданский, А.В.

Левданский, Б.Н. Кузнецов // Химия растительного сырья – 2012. – Том 4. – С. 79-83.

91. Pradere, U. Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs / U. Pradere, E.C. Garnier-Amblard, S.J. Coats, F. Amblard, R.F. Schinazi // *Chemical Reviews* – 2014. – Vol.114, №18. – P. 9154–9218.

92. Salt, A.N. Dexamethasone and Dexamethasone Phosphate Entry into Perilymph Compared for Middle Ear Applications in Guinea Pigs / A.N. Salt, J.J. Hartsock, F. Piu, J. Hou // *Audiology and Neurotology* – 2018. – Vol. 23, №4. – P. 245-247.

93. Subbaiah, M.A.M. Design strategies in the prodrugs of HIV-1 protease inhibitors to improve the pharmaceutical properties / M.A.M. Subbaiah, N.A. Meanwell, J.F. Kadow // *European Journal of Medicinal Chemistry* – 2017. – Vol. 139. – P. 865-883.

94. Fukui, T. Low-Dose Estramustine Phosphate Monotherapy in Castration-Resistant Prostate Cancer Patients / T. Fukui, K. Nakamura, T. Sakatani, T. Atsuta, T. Kato, T. Fukumoto, M. Ito, K. Inoue, A. Terai // *Hinyokika Kyo* – 2017. – Vol.63, №2. – P. 57-62.

95. Inoue, T. Effective and Safe Administration of Low-Dose Estramustine Phosphate for Castration-Resistant Prostate Cancer / T. Inoue, K. Ogura, M. Kawakita, H. Tsukino, S. Akamatsu, T. Yamasaki, Y. Matsui, T. Segawa, Y. Sugino, T. Kamoto, T. Kamba, S. Tanaka, O. Ogawa // *Clinical Genitourinary Cancer* – 2016. – Vol.14, №1. – P. 9-17.

96. Aurilio, G. Estramustine phosphate sodium in heavily pretreated patients with metastatic breast cancer: a retrospective consecutive case series / G. Aurilio, R. Graffeo, V. Bagnardi, F. Nolè, L. Adamoli, O. Pagani, E. Gallerani, B. Ferrari, G. Pruneri, A. Goldhirsch // *International Journal of Clinical Oncology* – 2015. – Vol.20, №1. – P. 90-94.

97. Sorscher, E.J. In vivo antitumor activity of intratumoral fludarabine phosphate in refractory tumors expressing E. coli purine nucleoside phosphorylase / E.J.

Sorscher, J.S. Hong, P.W. Allan, W.R. Waud, W.B. Parker // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* – 2012. – Vol.70, №2. – P. 321-329.

98. Aoyama, T. Population pharmacokinetics of fluconazole after administration of fosfluconazole and fluconazole in critically ill patients / T. Aoyama, K. Hirata, R. Hirata, H. Yamazaki, Y. Yamamoto, H. Hayashi, Y. Matsumoto // *Clinical Pharmacology & Therapeutics* – 2012. – Vol.37, №3. – P. 356-363.

99. Popławska, M. The safety and efficacy of fosphenytoin for the treatment of status epilepticus / M. Popławska, K.K. Borowicz, S.J. Czuczwar // *Expert Review of Neurotherapeutics* – 2015. – Vol.15, №9. – P. 1-10.

100. Inoue, Y. Bioavailability of intravenous fosphenytoin sodium in healthy Japanese volunteers / Y. Inoue, N. Usui, T. Hiroki, K. Shimizu, S. Kobayashi, S. Shimasaki // *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* – 2013. – Vol.38, №2. – P. 139-148.

101. Juluri, A. Transdermal iontophoretic delivery of propofol: a general anaesthetic in the form of its phosphate salt / A. Juluri, P. Peddikotla, M.A. Repka, S.N. Murthy // *Journal of Pharmaceutical Sciences* – 2013. – Vol.102, №2. – P. 500-507.

102. Кислицын, А.Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение [Текст] / А.Н. Кислицын // *Химия древесины*. - М.: Химия, 1994.

103. Соловьев, М.Е., Соловьев, М.М., Компьютерная химия, М.: СОЛОН-Пресс. 2005. 207 с.

104. Пат. 2270202 Российская Федерация, МПК С07J53/00, С07J63/00. 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.

105. Pat. US 3764616. Phosphate Esters of 17-acyloxy-21 Hydroxy Steroids of the Pregnane Series [Text] / Elks, J.; May, P.J.; Phillipps, G.H. Date of patent 09.10.1973.

106. ОФС.1.2.3.0020.15 Спектрофотометрическое определение фосфора.

107. Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Mihara, M. Uchiyama // *Analytical Biochemistry* – 1978. – Vol.86. – P. 271-278.
108. Sirota, T.V. A new approach to the investigation of adrenaline autooxidation and its application for determination of superoxide dismutase activity / T.V. Sirota // *Biomeditsinskaya Khimiya* – 1999. – Vol. 45, №2. – P. 263-272.
109. Соловьева, А.Г. Новый способ оценки динамики метаболизма крови у больных с термической травмой / А.Г. Соловьева, Ю.В. Зимин // *Современные технологии в медицине* – 2012. – Том 2. – С. 116-117.
110. Waterborg, J. H. The Lowry method for protein quantitation / J. H. Waterborg, H. R. Matthews // *Methods in Molecular Biology* – 1994. – Vol. 32, №1. – P. 1-4.
111. Begemann, H., Rastetter, J. Staining Methods. Atlas of Clinical Haematology. In: H. Begemann, J. Rastetter, editor. Berlin, Heidelberg: Springer. – 1972. – P. 9-12.
112. Pat. US 6689767. Triterpenes having antibacterial activity [Text] / Krasutsky, P.A., Carlson, R.M., Karim, R. // Date of patent 10.02.2004. P. 34.
113. Пат. 2243233 Российская Федерация, МПК С07J53/00, С07J63/00, А61К31/56, А61Р37/04. 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.
114. Михайленко, М.А. Получение и исследование физико-химических свойств сольватов бетулина / М.А. Михайленко, Т.П. Шахтшнейдер, М.Е. Брезгунова, В.А. Дребущак, С.А. Кузнецова, В.В. Болдырев // *Химия растительного сырья* – 2010. – Том 2. – С. 63–70.
115. Pat. CN 105342993. A Preparation technology of dexamethasone sodium phosphate injection. CN 201510758973; заяв. 10.11.2015; опубл. 24.02.2016.

116. Мецлер, Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке (в 3 томах). Том 2. - М.: Мир – 1980. – 608 с. (265 с.)
117. De Stefano, C. Speciation of phytate ion in aqueous solution. Non covalent interactions with biogenic polyamines / C. De Stefano, O. Giuffre, D. Milea, S. Sammartano // *Chemical Speciation and Bioavailability* – 2002. – Vol.15, №2. – P. 29–36.
118. Пат. 2044730 Российская Федерация, МПК C07D 239/36, A61K 31/505. Способ получения N-(β-гидроксиэтил)-4,6-диметилдигидропиримидона-2 [Текст] / Государственный научно-исследовательский институт "Кристалл" (RU); заявитель и патентообладатель. Абдрахманов И.Ш., Хисамутдинов Г.Х., Беляев П.Г., Шарыпова С.Г., Лядова Т.П.; авторы // № 5055446/04; заяв. 20.07.1992; опубл. 27.09.1995.
119. Османов, В.К. Взаимодействие N-(6-метил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидро-5Н-пиримидинсульфон)-N'-изоникотиноилгидразида с кислотами и основаниями в неводных средах / В.К. Османов, Е.С. Рыжова, Д.А. Пантелеев, Ю.В. Чудецкая, А.А. Волков, Н.Б. Мельникова, М.В. Гуленова, А.В. Борисов // *Химико-фармацевтический журнал* – 2010. – Том 4. – С. 42-49.
120. Свердлова, О.В. Электронные спектры в органической химии. Ленинград «Химия», Ленинградское отделение – 1985. – 248 с.
121. Кадис, Р.Л. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. пер. с англ. / Р.Л. Кадис, Л.А. Конопелько, Г.Р. Нежиховский // СПб.: ВНИИМ им. Д.И. Менделеева – 2002. – 149 с.
122. Khan, N. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate / N. Khan, F. Afaq, M. Saleem, N. Ahmad, H. Mukhtar // *Cancer Research* – 2006. – Vol.66. – P. 2500–2505.
123. Zhao, L. Synergistic effect of 5-fluorouracil and the flavonoid oroxylin A on HepG2 human hepatocellular carcinoma and on H22 transplanted mice / L. Zhao, Z. Chen, J. Wang, L. Yang, Q. Zhao, J. Wang, Q. Qi, R. Mu, Q.D. You, Q.L. Guo // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* – 2010, 65(3). – P. 481-489.

124. Xavier, C.P. Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation / C.P. Xavier, C.F. Lima, M. Rohde, C. Pereira-Wilson // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* – 2011. – Vol.68, №6. – P. 1449-1457.
125. Wei, J. Oleanolic acid potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells / J. Wei, H. Liu, M. Liu, N. Wu, J. Zhao, L. Xiao, L. Han, E. Chu, X. Lin // *Oncology Reports* – 2012. – Vol.28, №4. – P. 1339-1345.
126. Chen, G-Q. Combined antitumor effect of ursolic acid and 5-fluorouracil on human esophageal carcinoma cell Eca-109 in vitro / G-Q. Chen, Z-W. Yao, W-P. Zheng, L. Chen, H. Duan, Y. Shen // *Chinese Journal of Cancer Research* – 2010. – Vol.22, №1. – P. 62–67.
127. Leal, A.S.M. Preparation and biological evaluation of new triterpene derivatives of ursolic and oleanolic acid // *Dissertation* – 2012.
128. Yamai, H. Triterpenes augment the inhibitory effects of anticancer drugs on growth of human esophageal carcinoma cells in vitro and suppress experimental metastasis in vivo / H. Yamai, N. Sawada, T. Yoshida, J. Seike, H. Takizawa, K. Kenzaki, T. Miyoshi, K. Kondo, Y. Bando, Y. Ohnishi, A. Tangoku // *International Journal of Cancer* – 2009. – Vol.125. – P. 952–960.
129. Snegovoi, A.V. Practical recommendations for the correction of cardiovascular toxicity induced by chemotherapy and targeted drugs / A.V. Snegovoi, M.V. Vitsenya, M.V. Kopp, V.B. Larionova // *Malignant tumors* – 2016. – Vol.4, № 2. – P. 418–427.
130. Ambili, R. Toxicities of anticancer drugs and its management / R. Ambili // *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology* – 2012. – Vol.1, №1. – P. 2-12.
131. Carozzi, V.A. Toxicities of Therapeutic Agents Used in Medicine / V.A. Carozzi, G. Cavaletti // *Toxics* – 2016. – Vol.4, №3. – P. 1-3.
132. Xing, H. Selective Delivery of an Anticancer Drug with Aptamer-Functionalized Liposomes to Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo / H. Xing, L. Tang, X. Yang, K. Hwang, W. Wang, Q. Yin, N.Y. Wong, L.W. Dobrucki, N. Yasui, J.A.

Katzenellenbogen, W.G. Helferich, J. Cheng, Y. Lu // *Journal of Materials Chemistry B* – 2013. – Vol.1, №39. – P. 5288-5297.

133. Гулякин, И.Д. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолокарбазола ЛХС-1208 / И.Д. Гулякин, А. Хашем, Л.Л. Николаева, М.В. Дмитриева, Д.А. Афанасьева, М.А. Барышникова, Н.А. Оборотова, А.В. Ланцова // *Российский биотерапевтический журнал* – 2016. – Том 15. – С. 55-60.

134. Joanitti, G.A. Nanostructured Systems for the Organelle-specific Delivery of Anticancer Drugs / G.A. Joanitti, R. Ganassin, M.C. Rodrigues, J.P. Figueiro Longo, C.S. Jiang, J. Gu, S.M. Leal Pinto, M.F. Almeida Dos Santos, R.B. de Azevedo, L.A. Muehlmann // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* – 2017. – Vol.17, №3. – P. 224-236.

135. Gold, J. Inhibition of gluconeogenesis at the phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase reactions, as a means of cancer chemotherapy / J.Gold // *Oncology* – 1974. – Vol.29, №1. – P. 74-89.

136. Филов, В.А. Основные эффекты и механизмы действия сегидрина / В.А. Филов // *Русский медицинский журнал* – 2002. – Том 10, №24. – С. 1135–1138.

137. Gershanovich, M.L. Results of clinical study antitumor action of hydrazine sulfate. / M.L. Gershanovich, L.A. Danova, B.A. Ivin, V.A. Filov // *Nutrition and Cancer* – 1981. – Vol.3, №1. – P. 7-12.

138. Filov, V.A. Experience of the treatment with Sehydrin (Hydrazine Sulfate, HS) in the advanced cancer patients / V.A. Filov, M.L. Gershanovich, L.A. Danova, B.A. Ivin // *Investigational New Drugs* – 1995. – Vol.13, №1. – P. 89–97.

139. Strazhev, S.V. The use of hydrazine sulfate in optimization of palliative medical therapy and improvement of quality of life in cancer patients / S.V. Strazhev, A.Yu. Berezantsev, T.V. Karandeeva, A.A. Drobyazko // *Oncological coloproctology* – 2014. – Vol.2. – P. 13-17.

140. Hemaiswarya, S. Potential Synergism of Natural Products in the Treatment of Cancer / S. Hemaiswarya, M. Doble // *Phytotherapy Research* – 2006. – Vol.20, №4. – P. 239-249.

141. Pio, R. Complement inhibition: a promising concept for cancer treatment. / R. Pio, D. Ajona, J.D. Lambris // *Seminars in Immunology* – 2013. – Vol.25, №1. – P. 54–64.
142. Fulda, S. Betulinic acid: a natural product with anticancer activity. / S. Fulda // *Molecular Nutrition & Food Research* – 2009. – Vol. 53, №1. – P. 140-146.
143. Barrera, G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy / G. Barrera // *International Scholarly Research Notices: Oncology* – 2012. – P. 1-21.
144. Zheng, J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review) / J. Zheng // *Oncology Letters* – 2012. – Vol.4. – P. 1151–1157.
145. Berridge, M.V. Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer / M.V. Berridge, P.M. Herst, A.S. Tan // *Mitochondrion* – 2010. – Vol.10. – P. 584–588.
146. Diaz-Ruiz, R. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression / R. Diaz-Ruiz, M. Rigoulet, A. Devin // *Biochimica et Biophysica Acta* – 2011. – Vol.1807, №6. – P. 568–576.
147. Fantin, V.R. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumour maintenance / V.R. Fantin, J. St-Pierre, P. Leder // *Cancer Cell* – 2006. – Vol. 9. – P. 425–434.
148. Moreno-Sánchez, R. Energy metabolism in tumour cells / R. Moreno-Sánchez, S. Rodríguez-Enríquez, A. Marín-Hernández, E. Saavedra // *The FEBS Journal* – 2007. – Vol.274. – P. 1393–1418.

ПРИЛОЖЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) **2 660 649** (13) C1

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(51) МПК
[C07J 53/00 \(2006.01\)](#)
[C07F 9/117 \(2006.01\)](#)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 17.07.2018)

(21)(22) Заявка: [2017136761](#), 18.10.2017(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.10.2017Дата регистрации:
09.07.2018Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 18.10.2017(45) Опубликовано: [09.07.2018](#) Бюл. № [19](#)(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 6689767 B2, 10.02.2004. WO
2002026761 A1, 04.04.2002. RU 2477285 C1,
10.03.2013.Адрес для переписки:
603950, г. Нижний Новгород, Минина и
Пожарского пл., 10/1, БОКС-470

(72) Автор(ы):

Мельникова Нина Борисовна (RU),
Мальгина Дарина Сергеевна (RU),
Клабукова Ирина Николаевна (RU),
Жильцова Ольга Евгеньевна (RU),
Лебедева Регина Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Приволжский
исследовательский медицинский
университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(RU)

(54) Способ получения соли 3,28-дифосфата бетулина

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения солей 3,28-дифосфата бетулина, который может применяться в химико-фармацевтической промышленности. Предложенный способ включает обработку дифосфодихлорида бетулина водой, используя раствор дифосфодихлорида бетулина в диоксане, обработку осуществляют смесью воды и льда при температуре 0-4°C в течение 10-30 мин при молярном соотношении дифосфодихлорида бетулина и воды от 1:1000 до 1:4000, при этом полученный 3,28-дифосфат бетулина выделяют в виде аморфного гидрата с содержанием воды от 10 до 40%, после чего обрабатывают 3,28-дифосфат бетулина 0,2-4,0 М водным раствором основания, в качестве которого берут гидроксид натрия, или гидроксид калия, или карбонат натрия, или карбонат калия, или трисамин, при этом взаимодействие с гидроксидом натрия, или гидроксидом калия, или карбонатом натрия, или карбонатом калия осуществляют до pH 9-11, а с трисамином - до pH 9 с последующим получением соли. Предложен новый эффективный способ получения солей 3,28-дифосфата бетулина, не требующий затрат на поддержание высокого температурного режима при его осуществлении, с высоким выходом и чистотой соли. 2 з.п. ф-лы, 2 табл., 3 ил., 10 пр.


 «УТВЕРЖДАЮ»:
 И.о. проректора
 по учебной работе
 ФГБОУ ВО «ПИМУ»
 Минздрава России
 Е.С. Богомолова

« 02 » апреля 2018 года

АКТ

о внедрении в учебный процесс кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации результатов диссертационной работы Д.С. Малыгиной «Исследование, получение и стандартизация фосфатсодержащих производных бетулина», представленной на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Учреждение, в котором внедрена работа: кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Кем предложено: аспирантом кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России Малыгиной Д.С.

Форма внедрения: Результаты диссертационной работы Д.С. Малыгиной «Исследование, получение и стандартизация фосфатсодержащих производных бетулина» используются в научно-исследовательской и учебной работе на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии.

Сроки внедрения: 2018 год

Эффективность внедрения: Результаты диссертационной работы Д.С. Малыгиной «Исследование, получение и стандартизация фосфатсодержащих производных бетулина» активно используются в курсе обучения студентов III-V курсов фармацевтического факультета на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

Зав. кафедрой фармацевтической химии
и фармакогнозии ФГБОУ ВО «ПИМУ»
Минздрава России, д.х.н., профессор

Н.Б. Мельникова

Н.Б. Мельникова

Минина и Пожарского пл., 10/1, г. Нижний Новгород, 603950

«УТВЕРЖДАЮ»
 Заведующий структурным
 подразделением ГБПОУ НО
 «Нижегородский медицинский колледж»,
 к.фарм.н., отличник здравоохранения РФ
 И.А. Пегова
 «16» августа 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации Малыгиной Дарины Сергеевны на тему:
 «Исследование, получение и стандартизация фосфатсодержащих производных бетулина»
 на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности
 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в научно-исследовательскую работу
 фармацевтического отделения государственного бюджетного профессионального
 образовательного учреждения Нижегородской области
 «Нижегородский медицинский колледж».

Комиссия в составе председателя цикловой методической комиссии Л.В. Раскаткиной; к.п.н., заслуженного учителя РФ, преподавателя Т.Н. Поповой и к.х.н., заведующего практикой Е.С. Рыжовой подтверждает использование результатов, полученных Малыгиной Дариной Сергеевной в ходе работы над кандидатской диссертацией «Исследование, получение и стандартизация фосфатсодержащих производных бетулина» в научно-исследовательской и учебной работе фармацевтического отделения государственного бюджетного профессионального образовательного учреждения Нижегородской области «Нижегородский медицинский колледж».

председатель цикловой
 методической комиссии

Л.В. Раскаткина

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

Т.Н. Попова

к.х.н., заведующий практикой

Е.С. Рыжова



«УТВЕРЖДАЮ»
 Директор ГАУЗ НОЦККСЛС
 к.фарм.н.,
 И.В. Спицкая
 «18» апреля 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации Малыгиной Дарины Сергеевны на тему: «Исследование, получение и стандартизация фосфатсодержащих производных бетулина» на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в государственное автономное учреждение 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 по стандартизации фосфатсодержащих биологически активных веществ тритерпенового ряда, в том числе бетулиновых производных, полученных Малыгиной Дариной Сергеевной в ходе работы над кандидатской диссертацией «Исследование, получение и стандартизация фосфатсодержащих производных бетулина» 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: nockkksls@sandy.ru) на примере:

Методик стандартизации, валидации и определения общего фосфора, УФ, ИК и ОФ-ВЭЖХ анализа фосфатсодержащих бетулиновых производных.

Ответственные за внедрение:

Директор, к.фарм.н.

И.В. Спицкая

Начальник испытательной лаборатории

Е.В. Митрофанова

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

Локальный этический комитет №1
 ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России
 Адрес: 603005 Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. первого проректора –
 проректора по научной работе
 ФГБОУ ВО «ПИМУ»
 Минздрава России
 д.м.н. И.А. Клеменова



«11» апреля 2018 г.

**Выписка из протокола № 16
 заседания Этического Комитета по проведению научных исследований с
 животных в качестве объекта исследования.**

Дата проведения заседания «02» декабря 2016 г.

Место проведения заседания – ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения Российской Федерации», адрес: 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1.

В заседании участвовали:

председатель – д.б.н., зав. отделом физико-химических исследований ЦНИЛ ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России И.П. Иванова;

заместитель председателя - д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии НижГМА Минздрава России Е.А. Шевченко;

секретари – к.б.н., старший научный сотрудник отдела морфологии ЦНИЛ Н.Н. Проданец, к.б.н., старший научный сотрудник отдела электронной микроскопии ЦНИЛ М.В. Галкина;

члены этического комитета: д.м.н., профессор кафедры медицины катастроф НижГМА А.А. Григорьев, д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии Г.О. Гречканев, д.м.н., зав. кафедрой неврологии, нейрохирургии медицинской генетики В.Н. Григорьева, юрисконсульт Е.М. Лудина, д.м.н., зав. кафедрой хирургии ФПКВ С.А. Мухин, д.фарм.н., проф., зав. кафедрой управления и экономики фармации и фармацевтической технологии С.В. Кононова, д.м.н., доц. кафедры внутренних болезней И.В. Фомин, к.м.н., доцент кафедры хирургической стоматологии и челюстно – лицевой хирургии Н.Б. Рунова, д.б.н., профессор кафедры биохимии и физиологии ИББМ им. Н.И. Лобачевского В.Н. Крылов.

Локальный этический комитет №1
ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России
Адрес: 603005 Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1

Слушали:

Проект научной работы аспирантки кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии Малыгиной Дарины Сергеевны по подготовке диссертации на соискание степени кандидата фармацевтических наук «Исследование, получение и стандартизация фосфатсодержащих производных бетулина». Научный руководитель: д.х.н., профессор, Мельникова Нина Борисовна, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии.

Для обсуждения представлены документы:

Заявление

Актуальность

Планируемый стандартный протокол исследования

Характеристика (научная биография) исследователя

Этическое заключение (к.ф.н., Большакова Анастасия Евгеньевна, доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии)

Планируемый стандартный протокол исследования.

Цель

Исследование действия тритерпеноида природного происхождения дифосфата бетулина в водорастворимой форме (в виде натриевой соли или в комплексе с меглумином), а также его комбинированных препаратов с цитостатиками – 5-фторурацилом и гидразина сульфатом, в экспериментах *in vitro* на крови крыс и на модели привитой асцитной карциномой Эрлиха на мышах.

Задачи

1. Исследовать воздействие дифосфата бетулина, его солей и комплексов с цитостатиками или меглумином на антиоксидантную активность по уровню малонового диальдегида и по активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.
2. Исследовать воздействие дифосфата бетулина, его солей и комплексов с цитостатиками или меглумином на энергетический метаболизм, оценив активность лактат дегидрогеназы в прямой и обратной реакции.
3. Исследовать воздействие натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина и его комплексов с цитостатиками на цитологические характеристики асцитической жидкости мышей с привитой асцитной карциномой Эрлиха.
4. Исследовать воздействие натриевой соли 3,28-дифосфата бетулина и его комплексов с цитостатиками на выживаемость и общее состояние мышей с привитой асцитной карциномой Эрлиха.

Актуальность

Улучшение качества жизни пациентов является важной проблемой в онкологии наряду с проведением оптимальной фармакотерапии цитостатиками, лучевым и

Локальный этический комитет №1
ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России
Адрес: 603005 Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1

(или) хирургическим воздействиями. Этот вопрос связан с рядом серьезных побочных эффектов и общим токсическим влиянием на организм современных высокоэффективных противоопухолевых средств.

Современная тенденция в фармакотерапии направлена на применение известных и хорошо зарекомендовавших себя лекарственных веществ в новых лекарственных формах, предполагающих другие методы введения, например, селективную доставку, при которой доза цитостатиков может быть резко снижена. Альтернативным путем снижения дозы является использование биологически активных соединений природного происхождения, способных действовать в синергизме с цитостатиками.

В практической медицине представляют интерес широко распространенные и недорогие цитостатики, такие как сегидрин - гидразина сульфат и 5-фторурацил, характеризующиеся низкой величиной LD50, близкой к 0,32 мг/кг. В качестве компонента комбинированной терапии с цитостатиками представляют интерес тритерпеноиды лупанового ряда, такие как бетулин и его производные – бетулиновая и бетулоновая кислоты, их эфиры и амиды, проявляющие цитотоксическое действие на опухолевые клетки и низкую токсичность в отношении нетрансформированных клеток. Эффективность этих соединений в многочисленных экспериментах *in vitro* и *in vivo* показана при лечении меланомы, нейробластомы, гепатомы и др. Важную роль для достижения противоопухолевого эффекта играют антиоксидантные свойства.

Выбор такого производного бетулина как дифосфат бетулина в качестве компонента комбинированной терапии обусловлен его способностью выступать в качестве ингибитора комплемента, что является важным свойством противоопухолевых веществ.

Методы исследования

При исследовании биохимических показателей крови крыс будут использованы спектрофотометрические методы определения (уровень МДА в эритроцитах и плазме крови, активность СОД, каталазы, глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакции) на базе ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, отделение экспериментальной медицины с виварием, г. Н. Новгород.

При исследовании воздействия дифосфата бетулина и его комплексных препаратов с цитостатиками на цитологические характеристики асцитической жидкости мышей с привитой асцитной карциномой Эрлиха, а также на выживаемость и общее состояние животных будут использованы цитологические методы анализа на базе кафедры патологии с курсом патологической физиологии, ФГБОУ ВО "МГУ им. Н. П. Огарёва, г. Саранск.

Используемые средства:

1. Спектрофотометр Power Wave XS (Bio-Tek, США);
2. Аналитические весы ViBRA HT (Shinko, Япония);

Локальный этический комитет №1
 ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России
 Адрес: 603005 Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1

3. Охлаждаемая центрифуга Multifuge 1 SR (Германия);
4. Микроскоп Micros MC 100 (TS), Video Set (Австрия).

Количество и линия экспериментальных животных:

Крысы

- 1) вид – белые крысы;
- 2) порода – Вистар;
- 3) общее количество – 5 (5 самцов);

Мыши

- 1) вид – белые мыши;
- 2) общее количество – 50 (50 самцов);

Критерии включения в экспериментальное исследование:

Крысы

1. Масса тела в начале исследования – 200 г и более;
2. Возраст на начало исследования – 3-4 месяца.

Мыши

1. Масса тела в начале исследования – 20 г и более;
2. Возраст на начало исследования – 1-3 месяца.

Критерии исключения из экспериментального исследования:

Больные животные

Самки

Животные массой менее 200 г (для крыс), менее 20 г (для мышей)

Наркоз – Золетил (60 мкг/кг), Ксила (6 мг/кг).

Выведение животных из эксперимента – декапитация путем перерезки сонной артерии под наркозом.

Новизна исследования.

1. Будут исследованы антиоксидантные свойства дифосфата бетулина и его натриевой соли в комплексе с цитостатиками и с меглумином.
2. Будет определена степень воздействия натриевой соли дифосфата бетулина и ее комплексов с цитостатиками на энергетический метаболизм.
3. Будет исследовано воздействие натриевой соли дифосфата бетулина и его комплексов с цитостатиками на цитологические характеристики асцитической жидкости, на выживаемость и общее состояние мышей с привитой асцитной карциномой Эрлиха.

Практическая значимость.

Впервые будет обосновано комплексное применение цитостатиков 5-фторурацила и гидразина сульфата с тритерпеноидом лупанового ряда с улучшенной растворимостью в воде – натриевой солью дифосфата бетулина.

Локальный этический комитет №1
ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России
Адрес: 603005 Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1

Будет исследована антиоксидантная и противоопухолевая активность дифосфата бетулина и его комплексов. Разработка комплексных лекарственных препаратов цитостатиков с дифосфатом бетулина позволит снизить дозу цитостатиков и улучшить качество жизни пациентов. Кроме того, сам дифосфат бетулина обладает способностью ингибировать систему комплемента и является потенциальным противоопухолевым средством, и получение комплексных соединений дифосфата бетулина с меглумином, обладающих хорошей растворимостью в воде и высокими антиоксидантными свойствами, позволит разработать новые противоопухолевые лекарственные средства с повышенной биодоступностью.

Решение комиссии. Комиссия рассмотрела представленные материалы и выслушала доклад аспиранта кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России Малыгиной Дарины Сергеевны. Учитывая, что все эксперименты на животных проведены с применением анестезии, **согласно правилам гуманного обращения с животными**, а результаты исследования позволят проанализировать антиоксидантную и противоопухолевую активность, а также влияние на энергетический метаболизм тритерпеноида лупанового ряда дифосфата бетулина в водорастворимой форме (в виде натриевой соли или в виде комплекса с меглумином) и его комплексов с цитостатиками. Комиссия принимает положительное решение о возможности реализации проекта Малыгиной Дарины Сергеевны «Исследование, получение и стандартизация фосфатсодержащих производных бетулина».

Главный исследователь: заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии, д.х.н., профессор, Мельникова Нина Борисовна.

Клиническая база: ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, отделение экспериментальной медицины с вивариумом, г. Н. Новгород.

Адрес: 603155 Россия, Н.Новгород, Верхне-Волжская набережная, 18.

Заседание проведено согласно положению о локальном этическом комитете «ПИМУ»
Минздрава России.

Этический Комитет организован и работает в соответствии с требованиями ICH GCP, GLP и законодательства Российской Федерации.

Локальный этический комитет №1
 ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России
 Адрес: 603005 Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д.10/1

Постановили (нужное отметить):

Разрешить проведение исследований по проекту

Малыгиной Дарины Сергеевны «Исследование, получение и стандартизация фосфатсодержащих производных бетулина»

- Разрешить при условии _____
 Не разрешить, так как _____

Выписка верна

Председатель:
 д.б.н., зав. отделом
 физико-химических
 исследований ЦНИЛ
 ФГБОУ ВО «ПИМУ»
 Минздрава России

Иванова И.П. Иванова

Секретарь:
 к.б.н., старший научный
 сотрудник отдела
 морфологии ЦНИЛ
 ФГБОУ ВО «ПИМУ»
 Минздрава России

Проданец Н.Н. Проданец

Подписи д.б.н. И.П. Ивановой и к.б.н. Н.Н. Проданец заверяю

Ученый секретарь ученого совета
 ФГБОУ ВО «ПИМУ»
 Минздрава России, д.б.н.

Андреева Н.Н. Андреева



Проект фармакопейной статьи «Натриевая соль дифосфата бетулина»

НАТРИЕВАЯ СОЛЬ ДИФОСФАТА БЕТУЛИНА,

субстанция

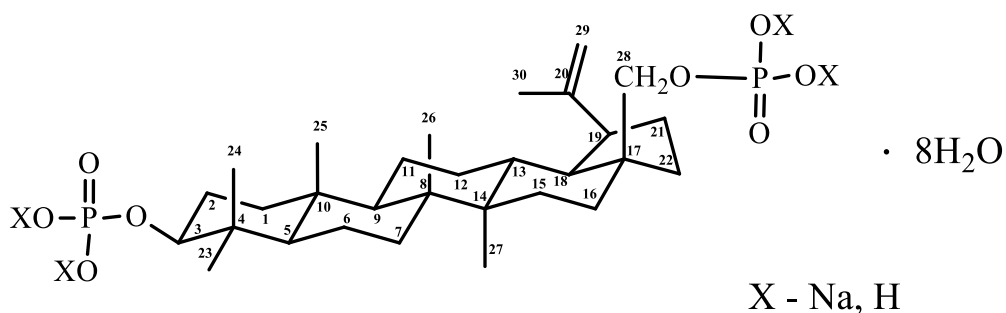
Международное непатентованное название:

Натриевая соль дифосфата бетулина.

Химическое название:

3β, 28-дифосфатокси-луп-20(29)-ена-1 натриевая соль.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{30}H_{48}O_8P_2Na_x \cdot 8$ воды, где $x = 3-4$.

Молекулярная масса безводной соли: 690,6 ($x = 4$)

Препарат содержит не менее 95,0% $C_{30}H_{48}O_8P_2Na_x$ в пересчете на сухое вещество.

Нормы качества субстанции Натриевая соль дифосфата бетулина

ПОКАЗАТЕЛЬ	МЕТОД	НОРМА
Описание	Визуальный	Белый кристаллический порошок
Растворимость	ГФ XIII	Легко растворим в воде, практически нерастворим в диоксане, хлороформе, ацетоне, толуоле, этаноле 96%, изопропаноле, дихлорметане, этилацетате и ацетонитриле.
Подлинность	ИК-спектроскопия	ИК-спектр исследуемой субстанции должен соответствовать ИК-спектру стандартного образца натриевой соли дифосфата бетулина.
	ЯМР-спектроскопия	³¹ P-ЯМР-спектры исследуемой субстанции должны соответствовать ³¹ P-ЯМР-спектрам стандартного образца натриевой соли дифосфата бетулина.
	УФ-спектроскопия	Оптическая плотность и длина волны основной полосы на спектре испытуемого раствора субстанции должны соответствовать оптической плотности и длине волны основной полосы на спектре раствора стандартного образца натриевой соли дифосфата бетулина.
	ДСК	Пики на ДСК-кривой исследуемой субстанции должны соответствовать пикам ДСК-кривой чистой натриевой соли дифосфата бетулина (эндотермический эффект при 103,7±8,0°C).
	Реакция с ванилином в конц. серной кислоте	Появление розово-красного окрашивания.
	pH	Водный 5 г/л раствор исследуемой субстанции должен иметь pH 7-8.
	Порошковая рентгеновская дифрактометрия	Порошковая рентгеновская дифрактограмма исследуемой субстанции должна соответствовать дифрактограмме стандартного образца.
	Реакция на ион натрия	Образование плотного осадка белого цвета.
Посторонние примеси	ВЭЖХ	Суммарное содержание примесей не более 5,0%.

ПОКАЗАТЕЛЬ	МЕТОД	НОРМА
Потеря в массе при высушивании при 105°C в течение часа	ГФ XIII	Не более 0,5%
Сульфатная зола	ГФ XIII	Не более 0,1%
Гидратная вода	ТГ	Не более 17%
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% ($C_{30}H_{48}O_8P_2Na_4$) в пересчете на сухое вещество
	P%	от 95 до 105% ($C_{30}H_{48}O_8P_2Na_4$) в пересчете на сухое вещество
Хранение	В хорошо укупоренной таре. В сухом, прохладном, защищенном от света месте, при температуре от 0 до +10°C.	
Срок годности	3 года	

Описание. Белый кристаллический порошок.

Растворимость. Легко растворим в воде (10 г/л), практически нерастворим в диоксане, хлороформе, ацетоне, толуоле, этаноле 96%, изопропанолем, дихлорметане, этилацетате и ацетонитриле.

Подлинность. Инфракрасный спектр субстанции натриевой соли дифосфата бетулина в области от 4000 до 400 cm^{-1} в КВг должен соответствовать спектру стандартного образца натриевой соли дифосфата бетулина по положению основных полос поглощения.

^{31}P -ЯМР спектр (D_2O) субстанции натриевой соли дифосфата бетулина должен содержать сигналы, δ , м.д.: 4,25, 4,31 (при C-3, дублет без развязки от протонов), 5,47 (при C-28).

УФ-спектры водного $5 \cdot 10^{-4}$ М раствора натриевой соли дифосфата бетулина регистрируются в диапазоне 230-300 нм. Оптическая плотность основной полосы при 256 на спектре испытуемого раствора натриевой соли дифосфата бетулина должна составлять $0,50 \pm 0,03$.

ДСК-кривые анализируемого образца должны иметь эндотермический эффект при $103,7 \pm 8,0^\circ\text{C}$.

Порошковая рентгеновская дифрактограмма образца натриевой соли дифосфата бетулина должна соответствовать дифрактограмме стандартного образца при измерении в 2θ диапазоне $5-50^\circ$ с шагом $0,026^\circ$ со скоростью сканирования $0,067335$ ($^\circ/\text{с}$).

Натриевая соль дифосфата бетулина, реагируя с концентрированной серной кислоте в присутствии ванилина, образует розово-красное окрашивание.

Водный раствор исследуемой субстанции (5 г/л) должен иметь рН 7-8.

К 2 мл раствора **Na-ДФБ** (7 – 10 мг натрий-иона) прибавляют 2 мл 15% раствора калия карбоната и нагревают до кипения, осадок не образуется. К раствору прибавляют 4 мл раствора калия пироксидимоната и нагревают до кипения. Охлаждают в ледяной воде и при необходимости протирают внутренние стенки пробирки стеклянной палочкой; образуется плотный осадок белого цвета.

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

Хроматограммы испытуемого раствора и стандартного образца регистрируют трижды.

Содержание примесей (дифосфата бетулина и бетулина) в процентах (x) в субстанции натриевой соли дифосфата бетулина 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 дифосфата бетулина или бетулина, вычисленное по трем хроматограммам раствора СО;

a_0 – навеска субстанции, г;

S_I – среднее значение площади пика дифосфата бетулина или бетулина, вычисленное по трем хроматограммам испытуемого раствора;

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

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

Суммарное содержание примесей дифосфата бетулина и бетулина в субстанции натриевой соли дифосфата бетулина должно быть не более 5%.

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 натриевой соли дифосфата бетулина сушат при температуре 100-105°C 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 натриевой соли дифосфата бетулина должно быть не более 0,1% (по массе).

Гидратная вода. Содержание гидратной воды в субстанции натриевой соли дифосфата бетулина определяют на ТГ-кривой по величине m/m_0 (%) первой ступени, соответствующей потере гидратной воды. Содержание гидратной воды должно быть не более 17% (по массе).

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

Количественное определение.

Количественное определение ВЭЖХ методом. Около 0,050 г (точная навеска) субстанции натриевой соли дифосфата бетулина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл воды, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. 20 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой 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 : буферный раствор KH_2PO_4 с $pH=6,36$ (90 : 10, об. %);
- объем вводимой пробы – 20 мкл;
- скорость потока ПФ – 1,0 мл/мин;
- детектор – диодно-матричный УФ детектор, 210 нм;
- температура колонки - 40°C.

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

Хроматограммы испытуемых и стандартных растворов регистрируют трижды.

Содержание натриевой соли дифосфата бетулина рассчитывается программой LCsolution по данным линейной градуировочной функции производной от трёх стандартных растворов. Вычисления основаны на измерении площадей пиков.

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

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

Примечание. 1. Приготовление стандартного раствора 1. Около 0,050 г (точная навеска) субстанции стандартного образца натриевой соли дифосфата бетулина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл воды, доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. 20 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм.

Раствор используют свежеприготовленным.

2. Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику натриевой соли дифосфата бетулина, не менее 2000 теоретических тарелок;
- коэффициент корреляции градуировочного графика для натриевой соли дифосфата бетулина не менее 0,95;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное по площадям пиков натриевой соли дифосфата бетулина, полученное для трех вводов стандартного раствора 2, составляет не более 2%.

Количественное определение Na-ДФБ по содержанию фосфора молибдатным методом (ГФ XIII) проводили с использованием в качестве стандартного образца фитата натрия ($\text{InsP}_6\text{Na}_2 \cdot y \text{H}_2\text{O}$) с содержанием фосфора 22% по массе.

Навеску (a_x) **Na-ДФБ** или **ДФБ** помещали в круглодонную колбу, добавляли 3 мл серной кислоты и 3 мл кислоты азотной концентрированной, далее ставили на песчаную баню ($t \sim 250\text{C}$) до обесцвечивания, затем добавляли 20 мл воды очищенной и продолжали нагревать еще 30 минут. Те же самые процедуры проводили с 0,018 г фитата натрия, содержащего 22% фосфора (Сертификат качества на субстанцию) и используемого нами в качестве стандарта.

Раствор из колб с исследуемыми веществами и стандартом переносили в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали. 15,0 мл полученных растворов помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл, прибавляли 35 мл воды, 5 мл восстанавливающего раствора, 10 мл раствора аммония молибдата и оставляли на 10 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая. Параллельно в аналогичных условиях готовили контрольный раствор, помещая 50 мл воды в мерную колбу

вместимостью 100 мл, 5 мл восстанавливающего раствора и 10 мл раствора аммония молибдата. Ровно через 10 мин в колбу с испытуемыми, стандартным и контрольным растворами прибавляли по 20 мл насыщенного раствора натрия ацетата, доводили объем раствора в каждой колбе водой до метки (100 мл), тщательно перемешивали и через 20-25 мин измеряли поглощение испытуемого и стандартного растворов на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 725 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно контрольного раствора.

Расчет количественного содержания фосфора $P_{обр}$ (%) в образце проводили по следующей формуле:

$$P_x(\%) = \frac{A_x}{A_{ст}} \cdot \frac{m_{ст(г)} \cdot P_{ст}}{m_x(г)} \cdot 100,$$

где:

$P_{ст} = 0,22$ – доля фосфора в стандарте фитате натрия;

$m_{ст}$ (г) – масса стандарта, взятого для анализа;

m_x (г) – масса предварительно высушенного до постоянной массы образца: при 160°C для **Na-ДФБ** и 105°C для **ДФБ**;

A_x и $A_{ст}$ – поглощение растворов исследуемого образца и стандарта при 725 нм.

Расчет количественного содержания **Na-ДФБ** проводят по формулам:

$$m_x = \frac{A \cdot P_{ст} \cdot m_{ст} \cdot \chi_{ст} \cdot V_{ал ст} \cdot V_{кол x}}{A_{ст} \cdot P_x \cdot V_{кол ст} \cdot V_{ал x}}, \text{ где}$$

A_x – оптическая плотность раствора **Na-ДФБ**,

$A_{ст}$ – оптическая плотность раствора $InsP_6Na_2 \cdot y H_2O$,

$m_{ст}$ – масса $InsP_6Na_2 \cdot y H_2O$,

$\chi_{ст}$ – степень чистоты $InsP_6Na_2 \cdot y H_2O$,

$P_{ст}$ – содержание фосфора в $InsP_6Na_2 \cdot y H_2O$,

$V_{кол ст}$ – объем колбы с раствором $InsP_6Na_2 \cdot y H_2O$ после минерализации,

$V_{ал ст}$ – объем аликвоты раствора $InsP_6Na_2 \cdot y H_2O$,

$V_{кол x}$ – объем колбы с раствором **Na-ДФБ** после минерализации,

$V_{ал x}$ – объем аликвоты раствора **Na-ДФБ**,

P_x – рассчитанное содержание фосфора в **Na-ДФБ** – 8,99%.

$$X\% = (m_x \cdot 100\%) / m_{x(\text{навеска})}$$

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

Упаковка. По 5 г в стеклянные банки с навинчивающейся плотно закрывающейся 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.