

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
ИНСТИТУТ ХИМИИ  
Кафедра органической и экологической химии

Заведующий кафедрой  
Д.х.н., профессор  
Кремлева Т.А.

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**  
магистра

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ОКИСЛЕНИЯ БЕТУЛИНА В СИНТЕЗЕ  
АЛЬДЕГИДОВ И БЕТУЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

04.04.01 Химия

Магистерская программа «Химия нефти и экологическая безопасность»

Выполнила работу  
Студентка 2 курса  
очной формы обучения

Яхина Элина Данияровна

Научный руководитель  
Д.х.н., профессор

Кулаков Иван Вячеславович

Рецензент  
К.х.н., доцент кафедры  
органической химии  
СПбГТИ (ТУ)

Свинцицкая Наталья Иосифовна

Тюмень  
2020

**Содержание**

Содержание .....	2
Введение .....	3
1. Литературный обзор.....	4
1.1. Биологическая активность бетулина и его производных.....	4
1.2. Методы извлечения бетулина из растительного сырья.....	9
1.3. Химическая модификация бетулина .....	12
1.4. Многокомпонентные реакции на примере синтеза Ганча .....	22
2. Обсуждение результатов.....	25
2.1. Выделение бетулина.....	26
2.2. Окисление бетулина реактивом Джонса .....	28
2.3. Окисление бетулина бихроматом калия на твердой подложке .....	31
2.4. Окисление бетулина селенистой кислотой.....	36
2.5. Многокомпонентная реакция с бетулоналем.....	38
2.6. Сравнительная таблица используемых методов.....	39
3. Экспериментальная часть .....	41
4. Заключение .....	46
5. Список литературы .....	47
6. Приложение .....	55

## Введение

В последние десятилетия всё большее внимание исследователей – химиков, биологов, медиков и фармацевтов привлекают природные биоактивные соединения. Производство современных лекарств в настоящее время неразрывно связано с применением соединений природного происхождения. Это связано с уникальной структурой и строением природных биоактивных соединений, потому синтетические модификации природных соединений с целью создания биологически активных агентов стали основой активно развивающегося направления тонкого органического синтеза и медицинской химии. В особенности исследования проводятся на основе соединений, о которых есть некоторые сведения. Одной из причин использования природных соединений является их распространенность и отработанная технология методов выделения соединений.

В качестве примеров таких соединений можно привести класс тритерпеноидов, включающий в себя множество соединений, применимых в различных отраслях. Так, одним из наиболее продвинутых объектов направленных синтетических превращений этого класса является глицирризиновая кислота и ее агликон [1-6].

Работы с представителями данного класса дали основания надеяться на успешное производство препаратов на основе тритерпеноидов лупанового ряда. Отдельное внимание уделяется бетулину ( $3\beta,28$ -дигидрокси-20(29)-лупен) — пентациклическому тритерпеновому спирту лупанового ряда, широко распространенному в природе и легко получаемому из березовой коры [7].

## Глава 1. Литературный обзор

Данный обзор включает информацию о биологической активности бетулина и его производных, о различной химической модификации бетулина и его производных, о способах получения и очистки данных соединений.

### 1.1. Биологическая активность бетулина и его производных

Природные соединения продолжительное время используются в качестве лекарственных средств. В период с 1981 года до 2010 года, основой для 64% одобренных лекарств являлись природные соединения или их полусинтетические производные. Стоит отметить, что в данной области наиболее распространены тетрациклические и пентациклические тритерпены [1]. Ценность вышеприведенных соединений заключается в их легкодоступности и высокой биологической активности. Примером таких соединений в том числе являются бетулин и его производные [2].

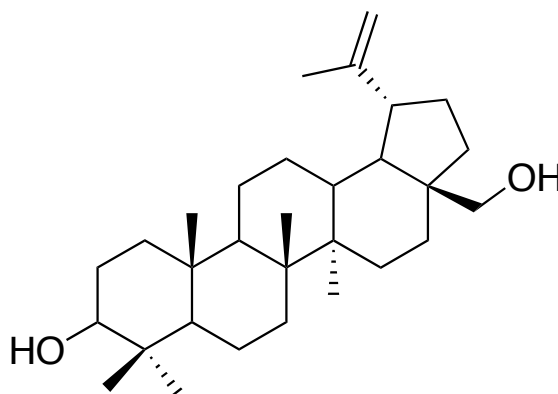


Рисунок 1. Структурная формула бетулина

Тритерпены представляют собой разнообразный класс природных соединений. Среди них, тритерпены пентациклического лупанового типа являются одним из наиболее значимых подклассов, который обладает рядом лечебных свойств [3]. Противоопухолевые свойства растительных экстрактов, содержащихся в тритерпеноидах лупанового типа, были обнаружены 25 лет назад. Их цитоактивность активно применяется на различных искусственно созданных системах рака *in vitro* и *in vivo* [4].

В особенности, терпены представляют собой обширную группу естественных соединений со значительным практическим значением. В нашей

повседневной жизни мы все встречаемся прямо или косвенно с различными терпенами, такими как моно- и сесквитерпеновые компонентами, эфирными маслами, которые придают аромат растениям, тритерпенами разных типов, содержащимися почти во всех высших растениях, в том числе тетратерпеновыми каротиноидами, политерпенами, из которых наиболее важным является латекс, используемый при производстве резины. Почти все терпены имеют некоторые биологические воздействия на животных, включая человека, а также играют значимую роль в медицине и фармацевтике [5]. Они обладают гепатопротекторными, желчегонными, антилитогенными, антиоксидантными, противовоспалительными, противоопухолевыми, противовирусными, иммуномодуляторными, нейропротекторными, антисептическими и антимуtagenными свойствами [1-6].

Последние двадцать лет исследований показали, что препараты на основе лупановых тритерпеноидов, могут быть использованы в качестве средства против множества болезней. Кроме того, лекарственные растения были одним из средств для лечения лейкемии, а в экспериментальных исследованиях доказана антилейкемическая активность нутрицевтиков [7]. Известно, что и производные бетулина обладают значительной цитотоксичностью против широкого спектра видов раковых клеток [8].

Бетулин может быть легко выделен из более чем двухсот видов растений, хотя самым богатым источником бетулин является семейство *Betulaceae*, особенно *Betula alba*, *B. pubescens*, *B. platyphylla* и *B. pendula* [9]. Бетулин естественным путем образуется весной в виде кристаллических скоплений в тонкостенных, крупных ячейках и отвечает за белый цвет березовой коры [10]. Количество бетулина в сухом весе бересты колеблется от 10% до 45%, причиной такой разницы могут являться множество факторов, таких как вид и возраст дерева, погодные условия, региональное местоположение и т.д. [11, 12]. Бетулин также присутствует в корнях и листьях березы, хотя его содержание значительно ниже по сравнению с наружной корой [13].

Несмотря на обширные положительные свойства бетулина, самым большим ограничением в его клиническом применении является его слабая растворимость в водных средах. Тем не менее, неоспоримым преимуществом бетулина является способность образования его более растворимых производных [14].

По международной токсикологической классификации бетулин относится к 4 классу малотоксичных веществ: его ЛД<sub>50</sub> составляет 9000 мг/кг. Бетулин не обладает аллергенным, канцерогенным, кожнораздражающим, кумулятивным, мутагенным, сенсibiliзирующим и эмбриотоксическим действием. Проведены исследования микробиологических показателей бетулина, как БАД и сырья для пищевой промышленности [1, 3, 5-7]

Производные бетулина также сохраняют биологическую активность. Так, в обзоре [15], посвященном последним достижениям лаборатории природных продуктов Северной Каролины (США), показано, что производные бетулиновой кислоты превосходят активность 3'-азидо-3'-дезокситимидина – первого средства против ВИЧ. А в работе [16] показана высокая гепатопротекторная (сравнима по силе с препаратом сравнения карсиллом) и иммуномодулирующая активность диникотината бетулина.

Авторами [17] доказано, что бетулоновая кислота на модели поражения слизистой оболочки желудка, вызванного введением индометацина и ацетилсалициловой кислоты, предотвращает образование деструкции слизистой оболочки желудка, хотя по противоязвенной активности оно уступает препарату вентер.

Также, из [18] следует, что в случае токсического гепатита, вызванного тетрахлорметаном, бетулиновая кислота обладает выраженной желчегонной активностью, сопоставимой с таковой у препарата сравнения – карсила.

Бетулоновая кислота является важным соединением в синтезе высокоактивных тритерпенов лупанового ряда (в том числе бетулиновой кислоты) и их тритерпеноидов (например, аллобетулона). Химия бетулоновой кислоты изучена слабее химии бетулиновой кислоты [8].

Бетулиновая кислота (3 $\beta$ -гидрокси-луп-20(29)-ен-28-овая кислота), выделенная в начале прошлого века под названием гратиолона [19], привлекла внимание исследователей в последнее десятилетие в связи с обнаружением у нее ряда биологических свойств. Так, в 1994 г. была обнаружена анти-ВИЧ-1 активность бетулоновой кислоты в культуре клеток H9-лимфоцитов. В 1995 г. было показано, что бетулоновая кислота является селективным ингибитором роста клеток злокачественной меланомы человека. Кроме того, бетулоновая кислота и ее производные обладают антибактериальной, антималярийной, противовоспалительной, желчегонной и другими видами активности [18-21].

В источнике [22] говорится, что бетулин легко превращается в бетулиновую кислоту. Показано, что это соединение и его производные нетоксичны и обладают широким спектром биологической активности, антиоксидантными свойствами и могут применяться для улучшения свойств существующих или создания новых продуктов в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности.

Как показано в [23], среди производных лупановых тритерпеноидов, в том числе со сложноэфирной и амидной связью, обнаружены вещества с противовирусной активностью.

Стало известно, что производные 3-алкиламидо-3-деоксо-бетулиновой кислоты обладают анти-ВИЧ-1 активностью. Перспективным соединением является 3,28-ди-О-никотинат бетулина, проявивший гепатопротекторную, противоязвенную, противовоспалительную, ранозаживляющую, анти-ВИЧ и иммуномодулирующую активность.

Одно из таких природных соединений, 28-гидрокси-3-оксолуп-20(29)-ен-30-аль [24], показало значительную цитотоксичность против клеточной линии NSCLC-N6. Chen и др. [25] в своем исследовании сообщили о наличии вышеприведенного альдегида в экстракте метанола, который, как сообщалось в публикации, выступал роли индикатора апоптоза человека, клетки лейкемии HL60 и способствовало расщеплению PARP и повышению регуляции белков Бакса [26]. Помимо этого, рассматривалось потенциальное влияние альдегида

на ингибирование роста клеток HL60 [27]. По их результатам [28] это соединение индуцировало апоптоз. Механизм действия альдегида по отношению к раковым клеткам до сих пор является предметом непрерывного исследования, а специфическая мишень до сих пор не идентифицирована. Поэтому подходящие производные лупана можно рассматривать как группу соединений, обладающих биологической активностью, которая может быть использована как для дальнейших химических, так и для биологических исследований. В настоящее время требования к этому типу редких тритерпеноидов природного происхождения огромны в современных медикаментозных исследованиях.

В связи с этим исследования химических превращений и биологической активности лупановых соединений, а именно бетулина, бетулонового альдегида, бетулоновой и бетулиновой кислот и их производных представляют особую ценность. Бетулин содержится в коре березы и является основным ее компонентом. Особенно высоким содержанием активных тритерпенов отличается береста (содержит до 40% бетулина). Кроме того, в бересте наблюдается наибольшее из всех аналогов содержание биологически активных представителей тритерпеновых [5-7].

Немалое количество исследований направлены на исследование анти-ВИЧ-активности бетулина и его производных. Для некоторых производных продукта окисления бетулина (дигидробетулиновой кислоты) анти-ВИЧ-активность выше, чем для бетулоновой кислоты. Кроме того, производные лупановых тритерпеноидов обладают иммуностимулирующим действием [29-32]. Известно также, что совместное применение бетулина и ацикловира усиливает противовирусный эффект обеих веществ. Бетулин с успехом используется при лечении актинического кератоза [33-34].



## 1.2. Сырье для получения бетулина

Бетулин был открыт Ловицем в 1788 году: при нагревании коры им наблюдалась сублимация. Позже он же обнаружил соединение и в березовой воде. Однако название «бетулин» было дано Мэзоном лишь в 1831 году. В последствии бетулин стали выделять экстракцией из коры березы. Наиболее богата им внешняя часть коры: содержание бетулина в ней колеблется в пределах 10–35%, доходя в отдельных случаях до 40%. Содержание бетулина и обуславливает белый цвет коры дерева [4, 35-38].

В экстракте коры содержится 70-80% бетулина. Помимо этого, она содержит и его окисленные формы, включая бетулиновую кислоту, но их получение таким способом нецелесообразно в связи с малым (не более 1%) содержанием [39]. Кроме того, экстракт содержит другой тритерпен – лупеол, содержание которого составляет 10% от бетулина, и другие хорошо изученные в настоящее время минорные вещества: лупан, лупенон, ацетат бетулина, аллобетулин, изобетуленол, олеаноловая кислота и другие [40-42]. Экстракты внутренних частей березы содержат незначительное количество бетулина и используются в основном как источник соединений, содержащих фенол [43].

Бетулин выделяют из березовой коры путем сублимации или экстракции органическими растворителями, в том числе ацетоном, этанолом и хлороформом. Количество бетулина в экстрактах коры варьируется от 70 до 80% и зависит от вида березы [44-48]. Другими продуктами выделения являются другие терпены: лупеол, бетулиновая кислота (до 12%), бетулональ [49]. С его выделением, датированным 1788 годом, бетулин остается одним из первых химических веществ, полученных естественным путем [50].

Анализируя патентную и научную литературу, можно сделать вывод, что для получения бетулина из коры березы используют в большинстве своем экстракционные методы [50-54].

Подобные исследования требуют эффективных методов получения бетулина из коры березы и очистки его от примесей. Большинство известных в литературе методов основаны на методах экстракции бетулина различными

растворителями [55]. Использование в качестве растворителей низших алифатических спиртов, хлороформа, ацетона, этилацетата, дихлорметана не выгодно, так как ведет к образованию сольватных комплексов с бетулином, что усложняет идентификацию [1, 3, 18-19, 56]. Кроме того, эти растворители малоселективны, растворяют как бетулин, так и примеси таким образом ухудшая качество получаемого бетулина [56-58].

Метод тонкопленочной экстракции является одним из наиболее эффективных методов экстракции бетулина [38-40, 59-60], который заключается в образовании тонкого слоя орошением бересты экстрагентом. Также очистить бетулин можно перекристаллизацией [61].

Основные достоинства метода:

- сокращение расхода экстрагента;
- облегчение выделения целевого продукта из экстрагента;
- упрощение технологической схемы;
- более безопасен в сравнении с аналогичными методами [62].

Недостатки экстракционного метода:

- растворимость бетулина в растворителях не превышает 10 г/л;
- экстрагируется не только бетулин, но и другие экстрактивные вещества;
- очистка бетулина, полученного таким методом, требует многократной перекристаллизации (понижающий выход бетулина фактор);
- токсичность растворителей;
- дополнительные расходы на утилизацию растворителей, что повышает стоимость бетулина [63].

В литературе широко обсуждались методы экстракции бетулина из бересты и сульфатного мыла [64]. Алифатические и ароматические углеводороды, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-спирты, ацетон и хлорированные растворители были предложены в качестве экстрагирующих агентов. Зависимость скорости экстракции бетулина от степени измельчения бересты была описана в [65]. Более 90% бетулина, присутствующего в бересте, поступает в раствор после 5-минутной экстракции сырья с размером частиц 0,15-1,5 мм. Этот процесс

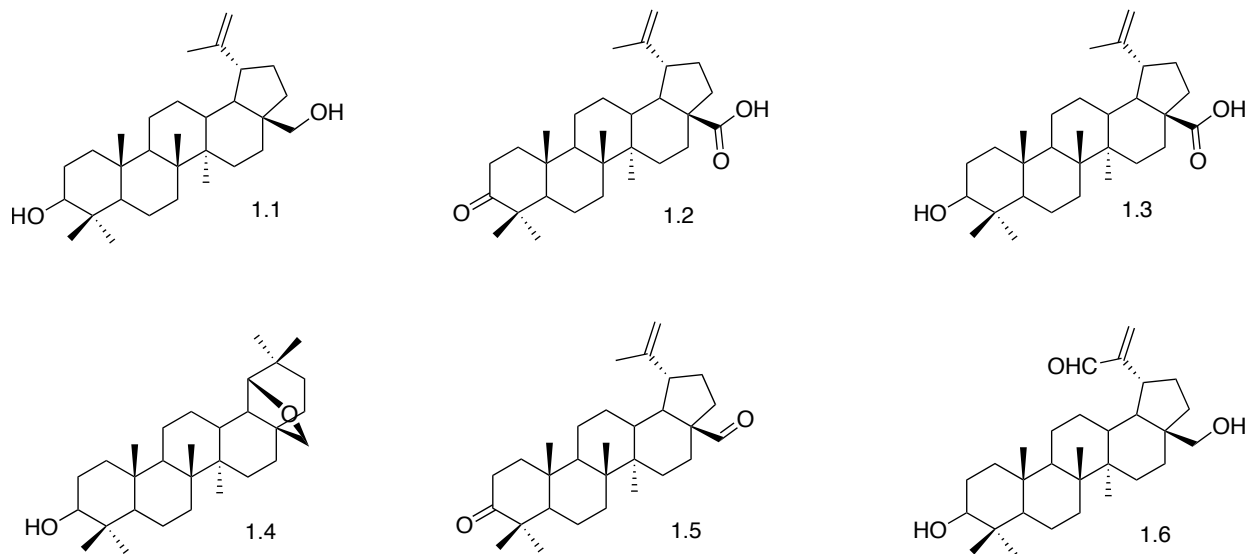
практически не зависит от экстрагирующего типа (углеводородный растворитель LIAV-20, дихлорметан, метанол, изопропанол-азеотроп, этанол, 2-бутанол-азеотроп, ацетон). С сырьем, имеющим большой размер частиц (0,8–4,0 мм), скорость и полнота экстракции зависят от вида экстрагирующего агента, возрастающего в следующем порядке: дихлорметан < изопропанол < 2-бутанол = ацетон < метанол < этанол. В то же время извлечение коры в автоклаве приводит к почти полной экстракции бетулина [66]. Авторы работы [67] показали, что предварительная активация сырья водяным паром в присутствии NaOH при 240°C в течение 1–3 мин. позволяет сократить время экстракции этанолом и достичь 97%-ой степени экстрагирования.

По мнению авторов [19] наилучший метод выделения бетулина – его выделение из бересты экстракцией нейтральными органическими экстрагентами, так, в качестве экстрагента используют растворы диоксан – вода с содержанием последней от 0 до 20 мас. %.

Подробно исследована кристаллизация бетулина – ключевая стадия очистки тритерпеноида-сырца [2, 68]. Наиболее подходящими растворителями для перекристаллизации являются азеотропы изопропанола и 2-бутанола. Потери бетулина в маточнике составляют 15–17%.

### 1.3 Химическая модификация бетулина

Согласно литературным источникам, весьма перспективными и интересными исходными веществами для последующего синтеза потенциально биологически активных соединений бетулинового ряда являются бетулин (1.1), бетулоновая (1.2) и бетулиновая (1.3) кислоты, а также аллобетулин (1.4), бетулоновый (1.5) и луп-20(29)-ен-3 $\beta$ ,28-диол-30-аль (1.6) [3, 25, 31, 45-48].



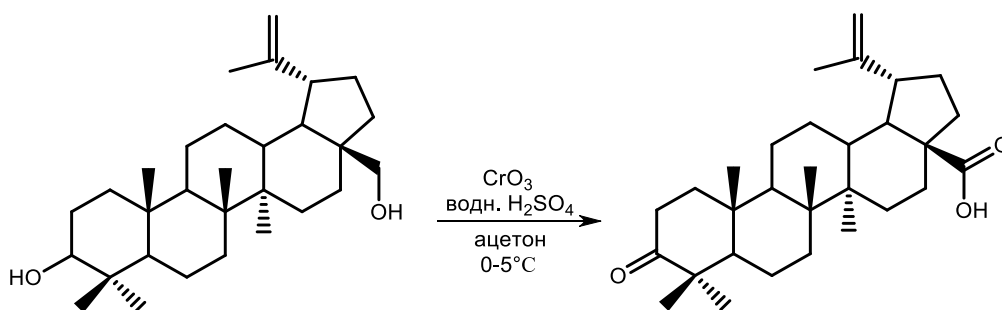
Для получения бетулоновой кислоты используют окисление суспензии бетулина с применением широкого ряда окислителей. В качестве окислителей различные авторы приводят несколько реагентов: перманганат калия [71] в присутствии дибензо-6-краун-12, азотная кислота [45] и хромовый ангидрид [46]. В то же время авторами [47] заявлено, что окисление первыми двумя реагентами идет неизбирательно, в отличие от хромового ангидрида, который в 2.2-кратном мольном избытке в уксусной кислоте приводит к полной конверсии бетулина с выходом 59% по конечному продукту.

Также избирательно проходит реакция окисления при использовании в качестве окислителя реактива Джонса [19]. Основными достоинствами реактива Джонса являются высокая скорость окисления в ацетоне и низкий процент побочных продуктов окисления по кратной связи [60, 65].



В работе [25] была проведена работа по изучению влияния времени окисления и соотношения бетулина и оксида хрома (VI) на выход целевого продукта. Указано, что оптимальное время реакции для получения бетулоновой кислоты – 4 часа (54,5%), при этом уменьшение или увеличение времени окисления вызывает резкое снижение выхода бетулоновой кислоты.

Увеличение количества оксида хрома (VI) от 1 до 7 молей на 1 моль бетулина увеличивает выход бетулоновой кислоты, снижая при этом время окисления до 30 минут. Таким образом, целесообразно проводить окисление в течение 0,5 часа при мольном соотношении бетулин:  $\text{CrO}_3$  – 1:7, выход при этом составляет 55%. Во всех работах в качестве растворителя предложен ацетон, окисление проводится при температуре  $0^\circ\text{C}$ . Отклонение условий проведения окисления от оптимальных приводит к резкому снижению выхода целевого продукта за счет протекания побочных реакций.



Авторы [20] использовали реактив Джонса для окисления экстракта бересты, полученного из кусковой бересты при экстракции водным изопропанолом в автоклаве при температуре  $80^\circ\text{C}$ , содержащего до 90 % и около 5 % лупеола. Бетулоновую кислоту, полученную после окисления экстракта бетулина, выделяли из бензольного раствора сырой реакционной массы в виде калиевой соли с выходом 82 %, что позволило обойтись без очистки колоночной хроматографией [49]. При подкислении спиртового раствора калиевой соли 5 % раствором соляной кислоты выделяли БК с выходом 85% и чистотой 95%, физико-химические данные полученного

соединения соответствовали литературным [72-75]. Суммарный выход БК в пересчете на исходный продукт составил 67 %.

В источнике [76] предложен способ очистки бетулоновой кислоты. Продукт реакции экстрагировали из раствора диэтиловым эфиром, экстракт промывали 10%-м раствором NaCl, после чего прибавляли к нему 4 н. раствор NaOH. При этом на границе раздела фаз выпадает натриевая соль бетулоновой кислоты. Соль отделяли и сушили, для выделения бетулоновой кислоты соль обрабатывали соляной кислотой и водой.

В источнике [77] предложен другой способ очистки бетулоновой кислоты. Растворитель (ацетон) упаривали, осадок промывали водой и сушили, после чего растворяли в бензоле и обрабатывали 10%-ым раствором KOH до полного осаждения соли. Осадок калиевой соли бетулоновой кислоты фильтровали, промывали бензолом и сушили. Выход соли составил 82%. Соль растворяли в метиловом или этиловом спирте, после чего раствор выливали в 15%-ый раствор соляной кислоты. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили.

Выделение бетулиновой кислоты из растительного сырья малорентабельно из-за низкого содержания (порядка 0,1%), поэтому более перспективным путем является ее последовательное получение из бетулина и бетулоновой кислоты. Известен ряд способов получения бетулиновой кислоты из бетулина, которые можно разделить на две группы. К первой группе способов относятся многостадийные схемы, позволяющие избежать изменения пространственной ориентации гидроксильной группы в положении 3 и получить биологически активный 3 $\beta$ -изомер. Сущность этих методов заключается в защите гидроксильных групп бетулина, снятии защиты у первичной гидроксильной группы, окислении первичной гидроксильной группы в карбоксильную, снятии защиты у вторичной гидроксильной группы. Впервые такой синтез был предложен в 1938 г. Л. Ружичкой и сотр. [53] и включал в себя стадию защиты гидроксильных групп бетулина ацетилированием, селективный гидролиз ацетильной группы при C-28,

окисление оксиметильной группы до карбоксильной и снятие ацетильной защитной группы при С-3. Недостаткам таких методов являются низкий выход конечного продукта и их многостадийность.

Вторая группа методов представлена двухстадийными схемами, позволяющими достичь желаемого результата более коротким путём, но с превращением небольшого количества целевого продукта (около 15 %) в биологически неактивную 3 $\alpha$ -гидрокси-20(29)-лупаен-28-овую кислоту (3 $\alpha$ -изомер). Преимущества этой группы методов связаны не только с сокращением числа стадий процесса, но и с увеличением выхода целевого продукта, даже с учётом снижения выхода 3 $\beta$ -изомера вследствие появления 3 $\alpha$ -изомера. В двухстадийных схемах получения бетулиновой кислоты бетулин вначале окисляют в бетулоновую кислоту, которую затем восстанавливают изопропилатом алюминия или комплексными гидридами в бетулиновую кислоту. Выходы бетулиновой кислоты в таком случае составляют порядка 90% [78].

Для получения аллобетулина проводят изомеризацию бетулина, которую впервые осуществили Шульце и Пиро в 1922 г. обработкой бетулинола кипящей 88%-ной муравьиной кислотой с последующим омылением образующегося формиата аллобетулина гидроокисью калия, по такой же двухстадийной схеме, через ацильное производное идет образование аллобетулина при обработке бетулинола уксусной кислотой, содержащей каталитическое количество серной кислоты. Но способ, предложенный Шульце и Пиро, сложный, двухстадийный, при нем безвозвратно теряются муравьиная кислота на образование формиата аллобетулина и гидроокись калия – на омыление формиата. Однако, возможен и одностадийный синтез бетулин – аллобетулин под воздействием бромисто-водородной кислоты в хлороформе или концентрированной соляной кислоты в этаноле.

Как сообщают авторы в патенте [54], существенные недостатки имеют и прямые способы изомеризации:

– бромистоводородная и хлористоводородная кислоты - очень сильные кислоты, требующие оборудования из дорогостоящих материалов (фторопласт, никель-молибденовый сплав, тантал);

– регенерация этих кислот из реакционной смеси чрезвычайно трудна;

– и, наконец, при изомеризации бетулинола в присутствии хлористоводородной кислоты, наряду с аллобетулином, с выходом примерно 20%, образуется побочный продукт изомеризации.

Поэтому в [54] авторами предложен более перспективный способ получения аллобетулина изомеризацией бетулина в органическом растворителе в присутствии катализатора, отличающийся тем, что в качестве катализатора используется ортофосфорная кислота.

Известно, что бетулин и бетулоновая кислоты изомеризуются в производные ряда олеанана с выходом не более 80% [55-57]. Авторы [58] проводили изомеризацию бетулиновой кислоты в хлороформе и использовали в качестве катализатора - трифторуксусную кислоту, что позволило им провести синтез 28-оксо-аллобетулона из бетулиновой кислоты с выходом 95% в течение 10 мин.

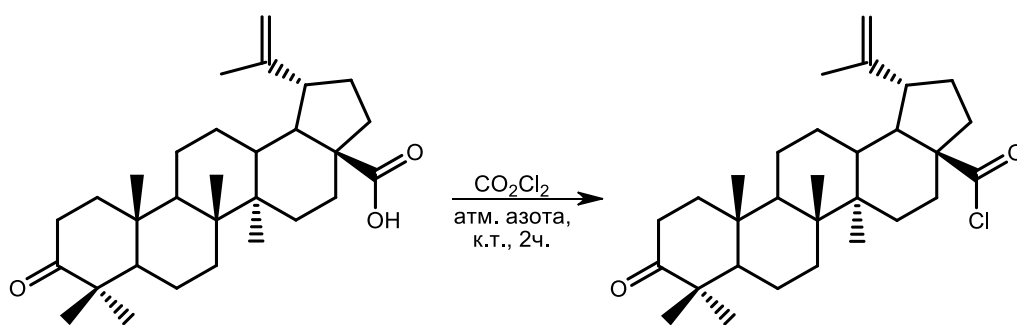
Список производных бетулина, бетулоновой и бетулиновой кислот с потенциальной биологической активностью чрезвычайно обширен. Так, предложены различные варианты этерификации бетулина, бетулиновой кислоты и их производных с образованием моно- и диацилатов различных кислот [37]. Большое внимание уделено синтезу амидов и пептидов бетулиновой кислоты и ее производных, в том числе и синтезу "обращенных" пептидов в связи с высокой анти-ВИЧ активностью дипептида бетулиновой кислоты [59-60]. Кроме того, была получена и запатентована серия O-, S- и N-гликозидов бетулиновой кислоты [33]. Достаточно активно исследуются реакции гидразидов бетулоновой и бетулиновой кислот. Так, они были практически количественно превращены с замещенными бензальдегидами в N-бензальгидразиды [31,61]. В то же время, производные бетулоновой кислоты в литературе хуже представлены, чем производные бетулиновой



кислоты. Так, тиосемикарбазидные и тиоуреидные производные гидразида бетулоновой кислоты совсем не описаны в научной литературе.

В связи с известным интересом к свойствам гидразидов бетулоновой кислоты и его производных важным является и то, какими путями его получают химики. Наиболее распространенным методом синтеза гидразидов является ацилирование гидразина или замещенных гидразинов в случае синтеза замещенных гидразидов различными производными карбоновых кислот, являющимися активными ацилирующими агентами, такими, как сложные эфиры (как ациклические, так и лактоны), ангидриды и хлорангидриды. Тем не менее, в изученной литературе в качестве ацилирующих агентов в синтезе гидразидов используются только хлорангидриды [31, 62, 63]. Вместе с тем принципиально ничто не ограничивает применение других соединений в качестве ацилирующих агентов.

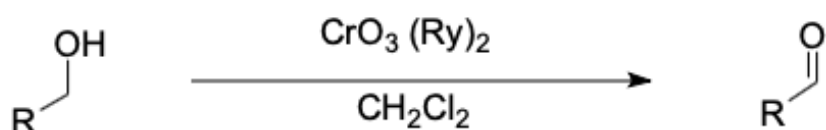
Синтез хлорангидрида бетулоновой кислоты в литературе представлен только мягким способом получения через взаимодействие оксалилхлорида с бетулоновой кислотой [31]. Хлорангидрид получают прибавлением по каплям эквимолярного количества оксалилхлорида к раствору бетулоновой кислоты в безводном бензоле при перемешивании в атмосфере азота при комнатной температуре в течение 2 часов до прекращения выделения газов с последующим упариванием растворителя в вакууме. Выход количественный.



Тем не менее, возможно применение и других методов получения хлорангидрида, таких, как взаимодействие безводной кислоты с тионилхлоридом ( $\text{SOCl}_2$ ), пятихлористым фосфором ( $\text{PCl}_5$ ) [64].

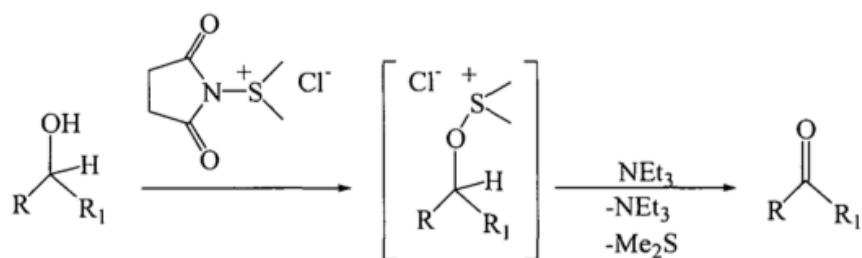
Окисление спиртов соединениями шестивалентного хрома, четырехвалентного марганца, шестивалентного селена, перекисью водорода, гипогалогенидами и кислородсодержащими кислотами [54] проходит до альдегидов и кетонов.

Окисление также проводят в безводной среде в присутствии шестивалентного хрома и бихромата пиридиния [66], реагентов Саретта и Коллинза [67] + дихлорметан в избытке.



Известно также об окислении по Сверну [68], известному тем, что это процесс мягкого окисления и первичных, и вторичных спирты (при этом реагирует только гидроксильная группа). Помимо всего прочего для первичных спиртов решается проблема с образованием кислот.

Окисление по Кори-Киму с применением комплекса хлорсукцинимида с диметилсульфидом также актуален, ведь это замена более сложному способу окисления по Оппенауэру алкоксидами алюминия [69].



Принимая в расчет особенности структуры бетулина окислительная селективность достигается путем защиты первичной гидроксильной группы уксусного ангидрида. Затем диацетат бетулина гидролизуется до образования моноацетата бетулина C<sub>3</sub>. Таким образом незащищенная гидроксильная группа C<sub>28</sub> окисляется до карбоксильной хромовым ангидридом в уксусной кислоте и бетулиновая кислота образуется после устранения защитных ацетатных групп.

Ряд новых соединений, содержащих шестивалентный хром с такими гетероциклическими соединениями, как хлорохромат пиридиния, бромхромат пиридиния, фторхроматимидазола, фторхромат пиридиния, дихромат имидазола были разработаны, чтобы улучшить селективность окисления органических соединений [71].

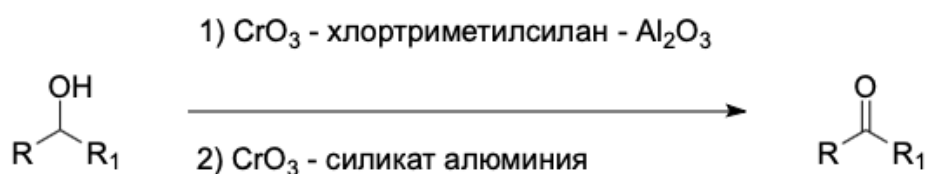
В источнике [72] предложен двухстадийный метод с использованием твердого оксида хрома и перманганата калия. В то время как окисление бетулина с  $\text{TEMPO}/\text{NaClO}_2/\text{NaOCl}$  при температуре  $35^\circ\text{C}$  дает выход бетулинового альдегида, равный 92%, в реакции бетулина с 4-ацетамидо- $\text{TEMPO}/\text{NaClO}_2/\text{NaOCl}$  при  $50^\circ\text{C}$  дал выход бетулиновой кислоты, равный 86%. Оба этих подхода, однако, являются мелкомасштабными препаратами, а полученные выходы умеренными. Кроме того, повышенная селективность окисления бетулина подходит только для производства бетулиновой кислоты или бетулинового альдегида.

Окисление бетулина до бетулоновой кислоты похоже на окисление стероидных гидроксидов. Обычно окисление хромовой кислотой стероидных или других природных тритерпенов, имеющих гидроксильные группы в положении  $\text{C}_3$ , протекает избирательно в присутствии ацетона, но реакция дает продукты окисления двойной связи, если ацетон поменять на любой другой растворитель. Окисление первичных спиртовых групп хромовой кислотой в ацетоне может протекать вплоть до альдегидов или кислот. Параллельные направления окислительных характеристик не кажутся целесообразными для практического синтеза производных бетулина, поэтому разработка практического синтеза бетулоновой кислоты с мягким, селективным, а главное с большим выходом окислением на первом этапе является очень важной задачей [73, 74].

В последнее время показана возможность высокого селективного окисления бетулина соединениями хрома (VI), иммобилизованными на твердой подложке оксида алюминия или силикагеля в донорных

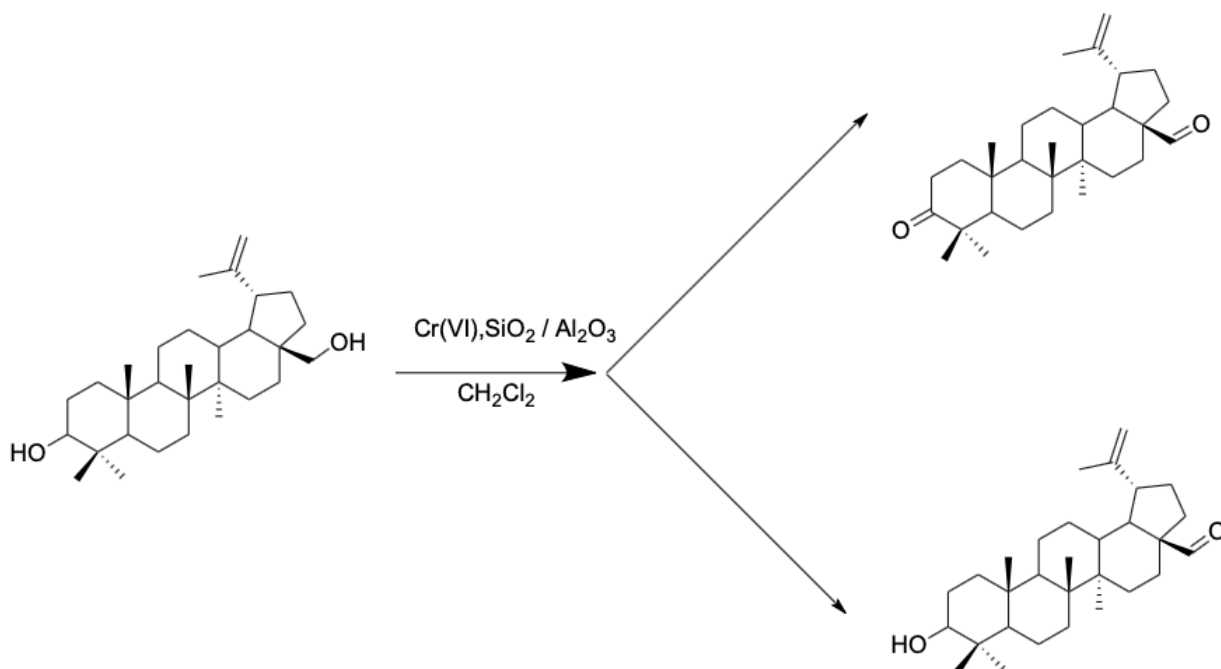
растворителях вплоть до бетулоновой кислоты в качестве промежуточного соединения в синтезе бетулиновой кислоты.

Одной из проблем окисления бетулина соединениями Cr (VI) является загрязнение продуктов реакции. Решением этой проблемы является использование твердой подложки, на которую путем адсорбции наносится реагент. Использование подложек делает синтез более экологичным, поскольку снижает токсичность и понижает массу отходов, удешевляет процесс, так как окислитель может быть использован вторично, дает возможность более легкого отделения окислителя от продукта реакции [73].



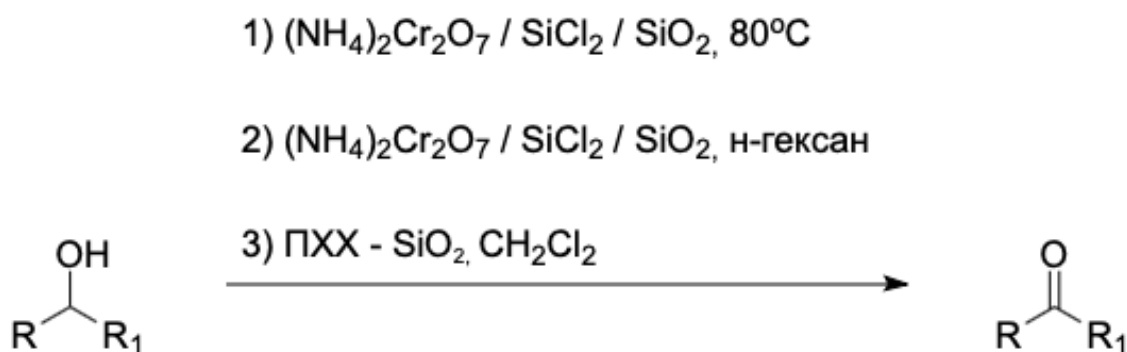
Роль твердой подложки может выполнять:

- ✓ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [75];
- ✓ Силикагель [74];
- ✓ Цеолиты [75].



Кроме того, некоторые трудноокисляемые спирты окисляются на влажном силикагеле следующими системами [36]:

- ✓  $\text{CrO}_3/\text{H}_5\text{IO}_6$ ;
- ✓  $(\text{NH}_4)_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ;
- ✓ N-метилбензиламмоний фторхроматом (VI);
- ✓ пиридиний хлорхроматом.



В литературных источниках есть данные, что получение бетулиновой кислоты можно проводить из бетулина, минуя стадию получения бетулоновой кислоты с применением следующих реактивов при  $50^\circ\text{C}$  в течение 120 мин. :

- ✓ бутилацетат;
- ✓ фосфатный буфер;
- ✓ 4-ацетамидо-ТЕМРО;
- ✓  $\text{Bu}_4\text{NBr}\cdot\text{H}_2\text{O}$  в водном растворе  $\text{NaClO}_2$  и  $\text{NaOCl}$ .

Таким образом, из проведенного литературного анализа приходим к выводу, что поиск новых биологически активных соединений на основе лупановых и родственных тритерпеноидов, в том числе и бетулина, в результате их целенаправленной химической модификации, является весьма актуальной и перспективной задачей.

#### 1.4. Многокомпонентные реакции на примере синтеза Ганча

1,4-Дигидропиридины и их производные являются важным классом гетероциклов в биологически активных и естественных молекулах [78]. Известно о нескольких методах получения 1,4-дигидропиридинов, в основном их число ограничивается модификацией и оптимизацией многокомпонентного синтеза Ганча между альдегидом, 1,3-дикарбонильным соединением и источником аммиака [79]. В то же время, для ароматизации 1,4-дигидропиридинов были широко изучены и использованы многочисленные окислительные реагенты, а именно  $\text{CuBr}_2$  [80],  $\text{SiO}_2/\text{P}_2\text{O}_5\text{-SeO}_2$  [81],  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Co}(\text{OAc})_2$  [82] и  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ /трет-бутилгидропероксид [83]. Однако поиск новых легкодоступных и "зеленых" методов все еще активно продолжается.

Более ста лет назад Артур Ганч [78] сообщил о реакции вследствие которой были получены 1,4-дигидропиридины (1,4-ДГП). Они являются важными прекурсорами в силу своей фармакологической и биологической активности и как блокада кальциевых каналов при сердечно-сосудистых заболеваниях. Клиническая значимость производных пирана, тиюфена 3-ацетилкоумарина на основе 1,4-ДГП связана с тем, что они, по сообщениям, обладают эквивалентным цитотоксическим эффектом, как и стандартный CHS 828, в отношении линии клеток рака молочной железы [84].

В последнее время предпринимаются различные попытки улучшить реакцию Ганча с использованием различных альтернативных процессов [6-10]. Однако в последние 10-15 лет большинство из этих реакций были отмечены новыми тенденциями в виде однокомпонентных многокомпонентных реакций (МКР), которые осуществлялись с некоторыми недостатками, такими как: более длительное время реакции, дорогостоящий 1,4-ДГП, такие как нифедипин, никардипин, амлодипин, фелодипин и другие, оказались полезными в качестве блокаторов кальциевых каналов и наиболее часто используются в качестве сердечно-сосудистых препаратов для лечения гипертонической болезни [83].

Ряд антагонистов дигидропиридина кальция были введены в качестве потенциальных препаратов для лечения застойной сердечной недостаточности и стенокардии [84]. 1,4-ДГП могут влиять на организм следующим образом: регрессия давления левого желудочка и сосудистая гипертрофия, почечная защита и антиатерогенная активность. Кроме того, 1,4-ДГП широко распространен во многих сосудах расширяющих, бронхолитических, антиатеросклеротических, противоопухолевых, антидиабетических, геропротекторных и гепатопротекторных препаратах. Они также функционируют в качестве нейропротекторов, как противотромбоцитарные средства для лечения агрегаторов и играют важную роль в борьбе с болезнью Альцгеймера в качестве противоишемического средства. Среди 1,4-ДГП также имеются примеры модификаторов лекарственной устойчивости, антиоксидантов и препарата для лечения недержания мочи [82, 84-87].

Интерес к 1,4-ДГП также поддерживается их структурным сходством с НАД - кофактором, используемым многими редуктазами в метаболизме. Для моделирования и понимания этих биологических свойств и разработки новых химиотерапевтических средств на основе мотива 1,4-ДГП были предпринимаются значительные усилия по созданию эффективных и быстрых методов их синтеза.

Описан эффективный одномоментный синтез 1,4-дигидропиридинов с хорошим или отличным выходом с помощью трехкомпонентной реакции Ганча с трифенилфосом и катализатором в виде ароматического альдегида, этилацетата и ацетата аммония. В последние годы значительное внимание уделяется синтезу 1,4-дигидропиридинов в силу их значительной биологической активности.

Чистая и эффективная процедура была создана для синтеза 1,4-ДГП посредством односточечных реакций Ганча в водной среде без использования катализатора и/или органического растворителя. Реакция со стехиометрическим молярным соотношением осуществлялась в герметичном

сосуде с водяным паром, воздухом или атмосферой азота, что позволяет получать соединения с хорошим или превосходным выходом и чистотой. После простой фильтрации 1,4-ДГП были выделены, и фильтрат можно было переработать и повторно использовать без существенного снижения выхода и чистоты. Новейшая и чистая методология дает такие преимущества, как короткое время реакции, хороший выход, простота эксплуатации, меньшее количество утечек и экологическая чистота [82].



## Глава 2. Обсуждение результатов

Химические трансформации природных соединений предоставляют неисчерпаемые возможности для поиска новых производных с высоким уровнем биологической активности. С целью поиска условий высокоэффективного селективного окисления бетулина до некоторых карбонильных и карбоксильных соединений была проведена серия исследований реакций окисления на различных твердых подложках, а также изучены процессы окисления традиционными методами (реактив Джонса).

**Целью** настоящей работы является оптимизация методов окисления бетулина в карбонильные соединения и бетулоновую кислоту.

Для реализации данной цели поставлены следующие **задачи**:

- 1) Выделение бетулина из бересты методом экстракции и его очистка до 95% чистоты.
- 2) Оптимизация и исследование методики получения продуктов окисления бетулина в различные альдегиды традиционным методом.
- 3) Оптимизация ВЭЖХ-методики определения продуктов реакции окисления бетулина в бетулоновый альдегид и соответствующую кислоту.

## 2.1. Выделение бетулина

Наиболее распространенные методы выделения бетулина основаны на экстракции бересты различными растворителями методом настаивания. Основными недостаткам этого метода являются длительность стадии выделения бетулина, обусловленная его невысокой доступностью для экстрагентов и низкой растворимостью в большинстве растворителей.

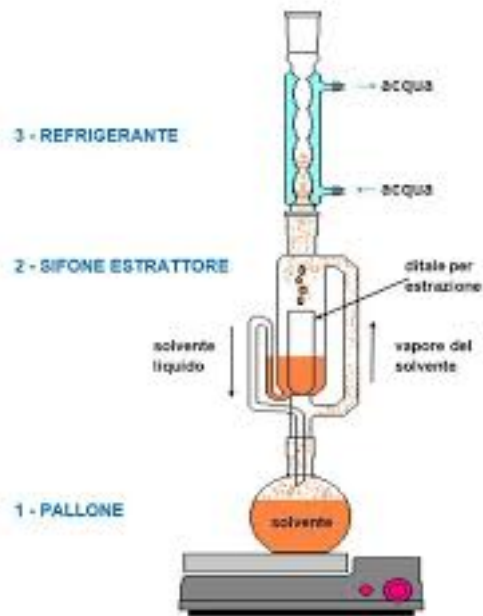
Проблемой извлечения бетулина из бересты занимается ряд ученых в России и за рубежом - Кислицын А.Н., Кузнецов Б.Н., Левданский В.А., Рошин В.И. и др. Имеются многочисленные научные публикации [3-8], касающиеся получения бетулина из бересты при различных условиях экстракции, а также многочисленным направлениям его использования. Опубликованных данных о промышленном производстве бетулина из бересты в России и за рубежом нет.

При выполнении данной работы бересту, собранную на юге Омской облсти, предварительно измельчали и высушивали при температуре 105°C.



*Рисунок 2. Измельченная береста – сырье для получения бетулина*

Затем проводили экстракцию с различными растворителями на экстракторе Сокслета.



*Рисунок 3. Установка для экстракции бетулина*

Одним из способов выделения бетулина из сырья является экстрагирование этанолом или 1,4-диоксаном с содержанием воды  $\sim 0,1\%$  при размере частиц 1,5 мм [17,19]. Однако, в связи с технологическими особенностями условия экстрагирования были изменены: размер частиц был увеличен до 5–10 мм, экстрагентом выступала система ИПС - хлороформ. Это привело к увеличению времени извлечения до 24 часов, что является недостатком используемой методики. Однако, именно последняя система является наиболее эффективной в плане выхода целевого продукта.

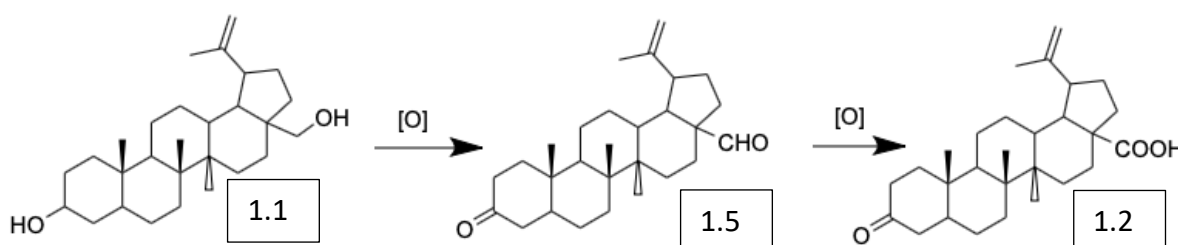
## 2.2. Окисление бетулина реактивом Джонса

Литературный поиск показал, что классическим окислителем в реакциях окисления бетулина выступает реактив Джонса. Несмотря на то, что из классических методов окисления реактив Джонса является самым оптимальным, его применение часто несет следующие неудобства:

- Небольшой выход получаемого продукта;
- Необходимость поддержания температуры около 0<sup>0</sup>C;
- Продолжительное время протекания реакции;
- Образование множества побочных продуктов как следствие невысокой селективности;
- Неэкологичность процесса вследствие сложности переработки окислителя и использования большого объема растворителя для многократной очистки целевого вещества.

В данной работе окисление бетулина с использованием данного окислителя проводили до бетулонового альдегида и бетулоновой кислоты [25].

Окисление бетулина до бетулоновой кислоты с использованием хорошо зарекомендовавшего себя окислителя - реактива Джонса [32,33], в состав которого входит система CrO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> неизменно давало низкие выходы, о чем сообщалось в нескольких [15,34,35] патентах. После многочисленных попыток оптимизации данной реакции были получены целевые вещества с выходом около 56%.



Стоит отметить, что процесс получения продуктов окисления осложняется побочными реакциями. Вследствие чего окисление бетулина реактивом Джонса требует жестких условий проведения, иначе побочные

реакции конкурируют с основным процессом и выход целевого соединения существенно снижается.

Окисление проводили по методике [23, 47] из бетулина с использованием реактива Джонса в качестве окислителя.

Окисление проводили при постоянном перемешивании и охлаждении до 0-5°C, постепенно добавляя реактив Джонса в мольном соотношении бетулин : CrO<sub>3</sub> в различных пропорциях, приведенных в таблице ниже.

Таблица 1. Окисление бетулина реактивом Джонса

Исходное вещество	Реагент/ растворитель	Молярное соотношение бетулина/Cr <sup>6+</sup>	Условия	Время, ч	Продукты реакции
Бетулин (1.1)	CrO <sub>3</sub> / 1,4-диоксан	1:2	0°C	0,3	<b>1.5</b>
Бетулин (1.1)	CrO <sub>3</sub> / 1,4-диоксан	1:2	0°C	0,6	<b>1.5, 1.2</b>
Бетулин (1.1)	CrO <sub>3</sub> / ацетон	1:3	0°C	4,5	<b>1.5, 1.2</b>
Бетулин (1.1)	CrO <sub>3</sub> / ацетон	1:6	0°C	2,5	<b>1.5, 1.2</b>
Бетулин (1.1)	CrO <sub>3</sub> / ацетон	1:7	5°C	1,5	-
Бетулин (1.1)	CrO <sub>3</sub> / ацетон	1:7	2°C	1,5	-
Бетулин (1.1)	CrO <sub>3</sub> / ацетон	1:7	0°C	1,5	<b>1.5, 1.2</b>

Для достижения поставленной цели варьировались условия синтеза: время и температура реакции. В результате было установлено, что для получения кислоты температура не должна превышать 0°C, иначе выход побочных продуктов превышает выход целевого продукта.

Кроме того, большое значение в данной реакции играет соотношение хромового альдегида и бетулина. Использовались соотношения 1:3, 1:6, 1:7. В первом случае, Конечными продуктами является бетулоновая кислота и соответствующий альдегид. При увеличении количества окислителя

относительно исходного соединения не только повышается выход кислоты, но и сокращается время синтеза. Таким образом, для получения бетулоновой кислоты оптимальное соотношение бетулина и хромового ангидрида составляет 1 к 7.

Реакция контролировалась методом ТСХ, ВЭЖХ и ИК-спектроскопии. Максимальный выход бетулоновой кислоты после перекристаллизации составил - 57%

В завершение было предпринято много попыток оптимизации этой реакции, и, наконец, мы смогли добиться успеха в получении больших выходов целевого продукта. Однако, более высокие выходы бетулоновой кислоты получают при двухступенчатом окислении через получение бетулонала.

Для получения бетулонового альдегида время реакции не должно превышать 20 минут. Бетулин предварительно был растворен в 1,4-диоксане с помощью УЗ-бани. После полного добавления окислителя охлаждение прекращалось, раствор нагревался до комнатной температуры. Время окисления также варьировалось в зависимости от желаемого продукта. Кроме того, известно, что увеличение количества хромового ангидрида уменьшает время проведения реакции.

Температурные условия для получения бетулоновой кислоты сохраняются и для получения альдегида, а вот оптимальное соотношение хромового ангидрида и бетулина в данном случае составляет 2 к 1.

Кроме того, для данного метода необходима последующая очистка и в том и в другом случае. Очистка была проведена в два этапа: сначала колоночная хроматография, затем перекристаллизация.

Реакция контролировалась методом ТСХ, ВЭЖХ и ИК-спектроскопии. Максимальный выход бетулонового альдегида составил 46%.

### 2.3. Окисление бетулина системой $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$ на твердой подложке

При окислении бетулина соединениями шестивалентного хрома возникает проблема загрязнения целевого продукта реакции. Принимая во внимание токсичность хрома, предпринимаются меры по нивелированию токсичного влияния на окружающую среду. Одним из способов является проведение реакции на адсорбирующем реагенте, примерами которого является окись алюминия и силикагель. Помимо снижения токсичности, применение данного метода позволяет многократно использовать окислитель в случае его регенерации, а также облегчает процесс очистки продукта реакции от окислителей. Кроме того, сопоставив результаты окисления на двух разных твердых подложках можно сделать вывод о стабилизирующем влиянии силикагеля при окислении до бетулонового альдегида, при действии окиси алюминия, напротив, окисление протекает до бетулоновой кислоты.

Известно, что при окислении бетулина соединениями хрома продуктами являются различные карбонильные и карбоксильные соединения.

Как было сказано ранее, метод отличается тем, что он наиболее экологичен в сравнении с другими методами, так как твердая подложка сорбирует токсичные ионы хрома различной валентности и таким образом они удаляются из реакционной смеси. Для снижения токсичности окисление проводят в неполярной среде.

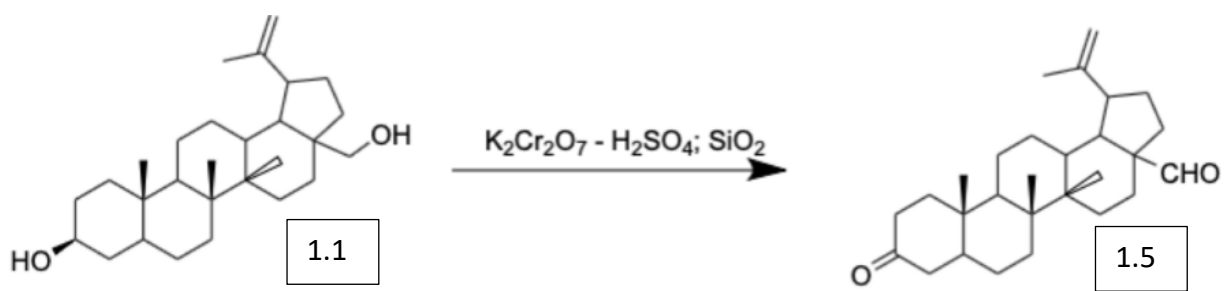


Схема окисления бетулина системой  $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$  на силикагеле

Установлено, что при окислении бетулина системой  $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4 - H_2O$  на  $SiO_2$  единственным продуктом окисления является бетулоновый альдегид.

После добавления окислительной смеси с сорбентом в молочно-белую суспензию бетулина в  $CH_2Cl_2$ , реакционная смесь гомогенизируется, первоначально приобретая оранжево-коричневую окраску (1 - 2 мин), затем по мере протекания процесса гранулы приобретают зеленую окраску - цвет соединений Cr (III). Рыжевато-коричневый верхний слой жидкой фазы отделяли от более тяжелого, не содержащего органических соединений, темно-зеленого жидкого слоя. После добавления воды к верхнему слою в жидкой фазе формируются белые хлопья бетулонового альдегида, которые отделяли и промывали водой.

Для достижения поставленной цели, нужно было варьировать условия синтеза: время и температуру реакции.

В первую очередь изменялась температура, при которой протекала реакция. При понижении температуры с 5 до  $0^{\circ}C$  высокая конверсия бетулина повышалась, что способствовало образованию смеси альдегидов: бетулинового и бетулонового в соотношении 5:95 соответственно. Увеличение времени окисления при  $0^{\circ}C$  до 140 мин приводит к получению единственного карбонильного соединения – бетулонового альдегида, однако его содержание уменьшается вследствие образования небольших количеств бетулоновой и бетулиновой кислот.

При температуре  $5^{\circ}C$  единственным продуктом реакции является бетулоновый альдегид и даже при увеличении времени протекания реакции его содержание остается неизменным.



Таблица 2. Окисление бетулина системой  $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$  на силикагеле

Исходное вещество	Реагент	Растворитель	Условия	Время	Выход бетулонового альдегида, %
Бетулин	$K_2Cr_2O_7$	$CH_2Cl_2$	$0^\circ C$	30 мин	84
Бетулин	$K_2Cr_2O_7$	$CH_2Cl_2$	$5^\circ C$	30 мин	87
Бетулин	$K_2Cr_2O_7$	$CH_2Cl_2$	$0^\circ C$	60 мин	84
Бетулин	$K_2Cr_2O_7$	$CH_2Cl_2$	$5^\circ C$	60 мин	87

Синтез бетулонового альдегида велся по описанной в литературе методике [35] из бетулина действием бихромата калия и серной кислоты на твердой подложке из силикагеля в течение 30 минут. Реакция контролировалась методами ТСХ и ВЭЖХ.

Таким образом, оптимальными условиями при окислении бетулина в бетулоновый альдегид является проведение реакции при охлаждении до  $5^\circ C$  в течение 30 мин. При этом максимальный выход продукта составил 87%.

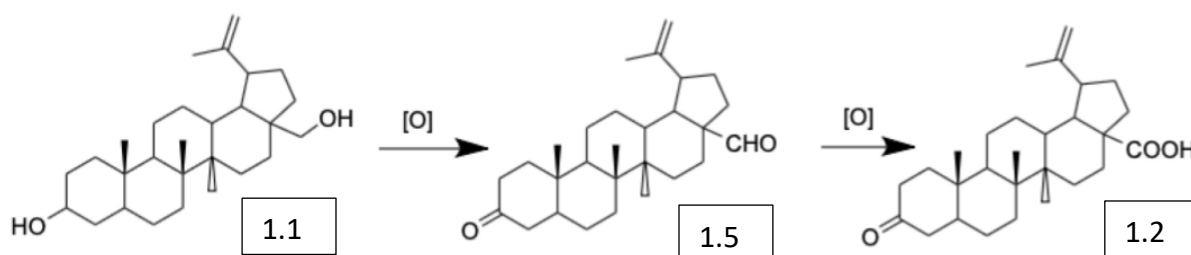
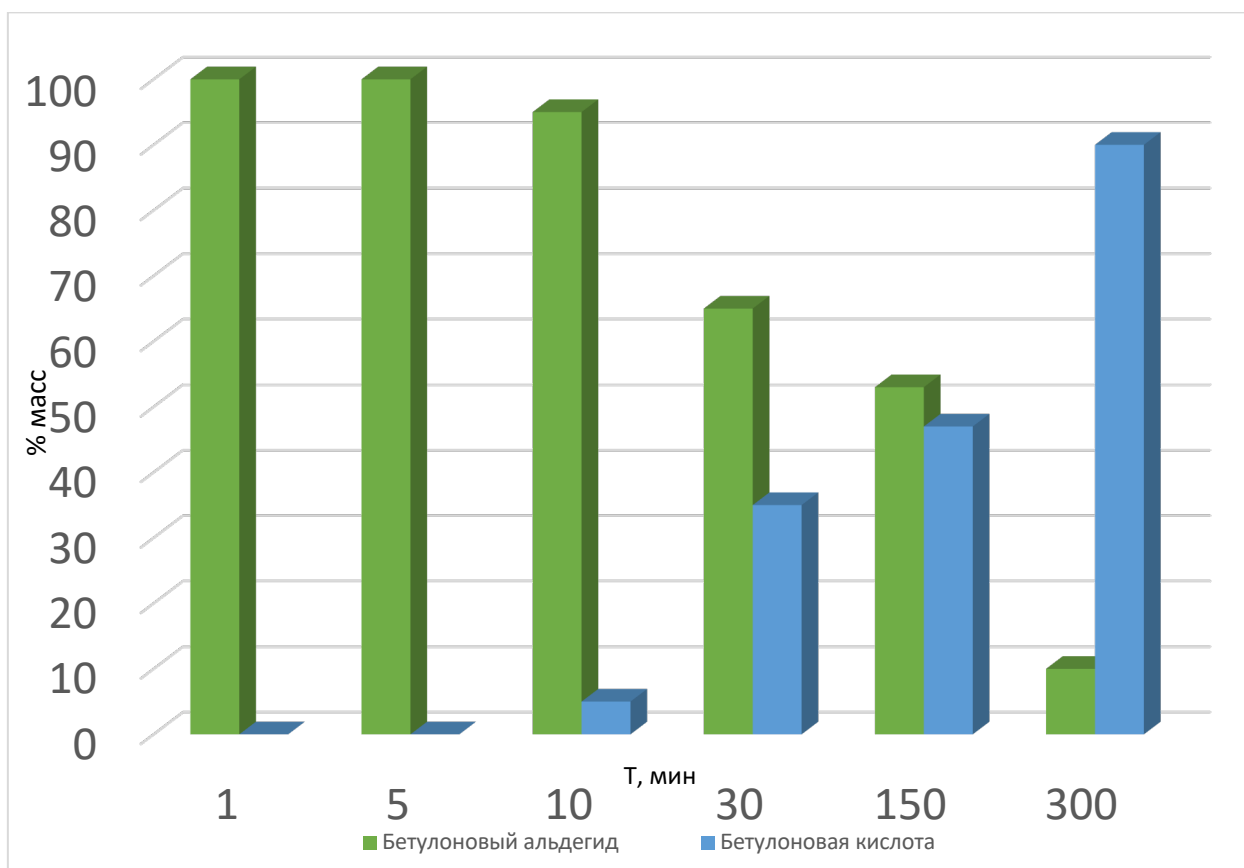


Схема окисления бетулина системой  $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$  на оксиде алюминия

При проведении аналогичной реакции на оксиде алюминия наблюдается образование не только бетулонового альдегида, но и его окисление до бетулоновой кислоты. Окисление на  $Al_2O_3$  при эквимолярном соотношении бетулина и окислителя в течении первых двадцати минут окисления показывает появление в реакционной смеси только бетулонового альдегида. При этом, согласно литературным данным, конверсия бетулина примерно в 2

раза ниже, чем в случае, когда твердой подложкой является силикагель. Через 40 минут помимо альдегида в реакционной смеси появляется бетулоновая кислота, а через пять часов основная масса бетулонового альдегида окисляется до бетулоновой кислоты.

Использование оксида алюминия в качестве твердой подложки при окислении бетулина подразумевает, что целевыми продуктами будут бетулоновый альдегид, а затем соответствующая кислота. Преимуществом твердой подложки из окиси алюминия является обусловленная ионами алюминия защита кратной связи и, как следствие, высокая селективность реакции.



*Рисунок 4. Зависимость конверсии бетулина и выхода бетулоновой кислоты от времени*

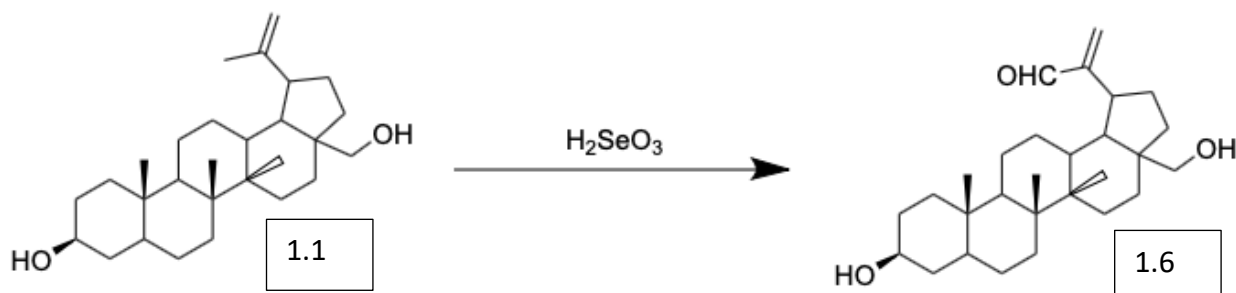
Это подтверждает и анализ (ИК-, ВЭЖХ, ТСХ) продуктов вышеприведенных реакций, где после образования в течение 20 минут бетулонового альдегида, направление реакций расходится: если на гранулах силикагеля все остается неизменным, то на частицах оксида алюминия

наблюдается образование бетулоновой кислоты, количество которой растет с течением временем и через несколько часов бетулонового альдегида в реакционной массе остается совсем немного. Нижеприведенные данные свидетельствуют о возможности контроля глубины окисления изменением температурного и временного режимов. ФХ свойства и ВЭЖХ продуктов соответствовали соответственно бетулоновому альдегиду и бетулоновой кислоте.

Таким образом, окисление бетулина в водно-ацетоновой среде системой бихромат калия – серная кислота на твердой подложке влажного оксида алюминия позволяет получить бетулоновую кислоту при температуре 15-20<sup>0</sup>С с выходом 79%. При этом сорбция соединений трехвалентного хрома частицами оксидом алюминия в процессе синтеза бетулоновой кислоты позволяет рационально удалять из смеси токсичные вышеуказанные соединения.

## 2.4. Окисление бетулина селенистой кислотой

В литературном обзоре ранее указывалось на значительную цитотоксичность производных бетулина, благодаря чему получение данных соединений представляет особый интерес. Одним из таких соединений, химические превращения которого широко исследуются, является луп-20(29)-ен-3 $\beta$ ,28-диол-30-аль, в небольших количествах обнаруженный в коре акации мелиферы [18, 34-36].



Окисление бетулина проводили по методике [85] с использованием селенистой кислоты в качестве окислителя. Однако вследствие отсутствия статьи и, соответственно, точной методики, условия реакции подбирались. Реакцию проводили при постоянном перемешивании и нагревании до 95°C, предварительно добавив в реакционную смесь бетулин, селенистую кислоту и 1,4-диоксан.

Для достижения поставленной цели варьировалось время реакции и соотношение бетулин : селенистая кислота. В результате контроля методом ТСХ было установлено, что время реакции составляет 40 часов. Соотношение бетулина и селенистой кислоты не влияет на выход реакции, но затрудняет очистку вследствие присутствия большего количества селена в реакционной смеси.

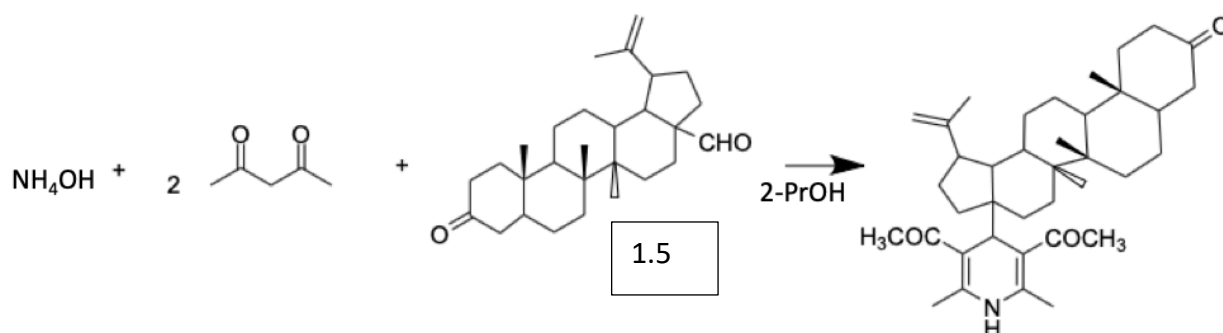
Таблица 3. Окисление бетулина  $H_2SeO_3$ 

Исходное вещество	Соотношение бетулин: $H_2SeO_3$	Растворитель	Условия	Время	Выход, %
Бетулин	1:1	1,4-диоксан	95°C	4 часа	-
Бетулин	1:1	1,4-диоксан	95°C	16 часов	-
Бетулин	1:1	1,4-диоксан	95°C	20 часов	17
Бетулин	1:1	1,4-диоксан	95°C	40 часов	38
Бетулин	1:2	1,4-диоксан	95°C	20 часов	17
Бетулин	1:2	1,4-диоксан	95°C	40 часов	38

Сложность очистки и выделения целевого продукта заключается в обособлении его от селена. Для этого селен предварительно осаждают ацетоном, а затем очищают с помощью колоночной хроматографии. Элюентом служил дихлорметан – гептан (1:4). Полученный порошок белого цвета перекристаллизовывали. Процедуру очистки многократно повторяли до исчезновения следов селена.

## 2.5. Многокомпонентная реакция с бетулоналем

Карбонильные производные бетулина представляют интерес тем, что они являются природными соединениями, которые можно вводить в синтетические в ходе многокомпонентных реакций для снижения токсичности лекарственных средств на основе вторых.



Провели пробную реакцию Ганча с бетулоналем. Альдегид вступал в реакцию с ацетилацетоном и аммиаком в течение 40 минут.

Реакционная смесь нагревалась в колбе с обратным холодильником на водяной бане при температуре  $75^\circ\text{C}$ . Реакция контролировалась методом ТСХ. Реакционную смесь, изначально полученную в виде масла, подвергли перекристаллизации смесью растворителей ацетон - гексан. Получили мелкокристаллическое белое вещество с выходом 7%, отличающееся по температуре плавления ( $218\text{-}220^\circ\text{C}$ ) от бетулонового альдегида.

## 2.6. Сравнительная таблица используемых методов

Данная таблица представляет собой обобщение используемых в работе методов окисления.

Таблица 4. Обобщающая таблица по использованным методам окисления бетулина

Исходное вещество	Окислитель	Получаемое вещество	Выход, %	T, °C	Время реакции, мин
Бетулин	$K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4, Al_2O_3$	Бетулоновый альдегид (1.5)	-	15-25°C	10
Бетулин	$K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4, Al_2O_3$	Бетулоновая кислота (1.5)	82	15-25°C	300
Бетулин	$K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4, SiO_2$	Бетулоновый альдегид (1.5)	87	5°C	30
Бетулин	Реактив Джонса	Бетулоновая кислота (1.2)	57	0°C	90-210
Бетулин	Реактив Джонса	Бетулоновый альдегид (1.5)	46	0°C	20
Бетулин	$H_2SeO_3$	Луп-20(29)-ен-3β,28-диол-30-аль (1.6)	38	95°C	2400

Реактив Джонса является наиболее удобным методом окисления среди классических методов окисления бетулина, однако имеет несколько существенных недостатков. Даже при увеличении количества шестивалентного оксида хрома относительно бетулина не дает необходимого результата. Что касается температурного режима, повышение температуры даже на 2-5°C ведет к тому, что основными полученными продуктами являются побочные. Следовательно, в ходе реакции необходимо поддерживать температуру строго 0°C. Также реакция должна протекать точно определенное время. Необходима перекристаллизация и колоночная хроматография для очистки полученных веществ.

Метод окисления в системе  $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$  на твердой подложке в виде силикагеля протекает при комнатной температуре в течение непродолжительного времени и позволяет получить целевой продукт с гораздо большим выходом в сравнении с классическим методом. Несмотря на необходимость перекристаллизации в метаноле, процесс бетулонала, полученного данным методом, значительно проще предыдущего.

Несмотря на то, что для получения бетулоновой кислоты окислением в системе  $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$  на твердой подложке в виде окиси алюминия необходимо 5 часов, это нивелируется высоким выходом и тем, что реакция протекает при комнатной температуре.

Стоит отметить, что применение твердой подложки позволяет регенерировать окислитель для его повторного использования. Также простота очистки полученных соединений не требует больших затрат растворителей для очистки, чего нельзя сказать об окислении реактивом Джонса.

Получение луп-20(29)-ен-3β,28-диол-30-оля занимает продолжительное время и требует многократного применения перекристаллизации и колоночной хроматографии в связи с наличием большого количества элементного селена.



### Глава 3. Экспериментальная часть

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  записаны на спектрометре Jeol ECX400A 400 с рабочей частотой прибора 400,13 МГц. Химические сдвиги измерены по отношению к сигналу внутреннего стандарта – тетраметилсилана ( $\delta = 0,00$ ).

ИК-спектры регистрировали на спектрометре Agilent Technologies марка Cary 600 Series FTIR Spectrometr и на приставке НПВО.

Контроль за ходом реакции и чистотой полученных соединений проводили методом ТСХ на пластинках Sorbfil, проявление парами йода или УФ-светом.

Температуру плавления определяли на столике Кофлера.

#### 3.1. Выделение бетулина из бересты [17]

Для получения бетулина использовали бересту *Betula Pendula* Roth (продукт переработки на различных фабриках по производству мебели или фанеры).

В реактор загружают сухую и измельченную бересту (100 г), МТБЭ (1 л) и нагревают до  $55^\circ\text{C}$  ( $T_{\text{кип}}$  МТБЭ). Экстракт выдерживали при данной температуре около 4 часов, после чего отфильтровали и экстрагировали еще 3 раза МТБЭ. Для того, чтобы экстракт был более концентрированным, МТБЭ отгоняют, к осадку добавляют 200 мл 1%-го раствора щелочи и нагревают. К горячему водному раствору добавили 300 мл воды, нагревали в течение часа до выпадения осадка, водный слой отделяют. Осадок сушили при комнатной температуре.

Для достижения чистоты бетулина провели перекристаллизацию из изопропилового спирта.

Физико-химические характеристики бетулина соответствовали литературным данным:

$$T_{\text{пл}} = 261^\circ\text{C}$$

ИК-спектр,  $[\nu] = [\text{cm}^{-1}]$ , (КВг): 3363 ( $\nu\text{-OH}$ ), 3070 ( $\nu\text{-CH}$ ), 2941, 2868 ( $\nu\text{-H}$ ), 1643( $\nu\text{-C}$ ), 1028( $\nu\text{CH}_2\text{OH}$ ), 881( $\delta_{\text{C}=\text{CH}_2}$ ).

## 3.2. Окисление бетулина реактивом Джонса

### 3.2.1. Получение бетулоновой кислоты [42]

В трехгорлую колбу загрузили 1 г бетулина и 40 мл очищенного ацетона. РС охладили до 0°C и при перемешивании добавляли по каплям реактив Джонса в ацетоне. По окончании реакции в колбу добавили 10 мл этилового спирта  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (продолжили перемешивание в течение 15 мин). Затем в РС вылили в 100 мл смеси  $\text{H}_2\text{O}_{(л)}$  и льда и 10 мл соляной кислоты  $\text{HCl}$  (33%). Осадок отфильтровали, промыли водой до нейтральной реакции.

Ход реакции контролировали методами ТСХ. Время удерживания основного пика на ВЭЖХ (рис. П1) продукта соответствовало времени удерживания основного пика на хроматограмме стандарта бетулоновой кислоты. Максимальный выход продукта составил 57%.

Физико-химические характеристики бетулоновой кислоты после перекристаллизации соответствовали литературным данным:

$$T_{\text{пл}} = 251^\circ\text{C}$$

ИК-спектр (рис. П2),  $[\nu] = [\text{см}^{-1}]$ , (KBr): 3410 ( $\nu\text{-OH}$ ), 3070 ( $\nu\text{-C-H}$ ), 2945, 2868 ( $\nu\text{-H}_{\text{ас,с}}$ ), 1705 ( $\nu\text{-C=O}$ ), 1642 ( $\nu\text{-C-C}$ ), 1457 ( $\delta\text{OH}$ ), 1377 ( $\delta\text{CH}_3\text{ sy}$ ), 1240, 1201, 1180, 1140, 1115 ( $\nu\text{-C-O}$ ), 883 ( $\delta\text{C=CH}_2$ ).

### 3.2.2. Получение бетулонового альдегида

В трехгорлую колбу загрузили 1 г бетулина и 40 мл очищенного ацетона. РС охладили до 0°C и при перемешивании добавляли по каплям реактив Джонса в ацетоне. По окончании реакции в колбу добавили 10 мл этилового спирта  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (продолжили перемешивание в течение 15 мин). Затем в РС вылили в 100 мл смеси  $\text{H}_2\text{O}_{(л)}$  и льда и 10 мл соляной кислоты  $\text{HCl}$  (33%). Осадок отфильтровали, промыли водой до нейтральной реакции.

Ход реакции контролировали методами ТСХ. Время удерживания основного пика на ВЭЖХ продукта соответствовало времени удерживания основного пика на хроматограмме стандарта бетулонового альдегида. Максимальный выход продукта составил 46%.

Физико-химические характеристики бетулонового альдегида соответствовали литературным данным [44]:

$$T_{пл} = 164 \text{ } ^\circ\text{C}$$

ИК-спектр (рис. П4),  $[\nu] = [\text{см}^{-1}]$ , (KBr): 2941, 2868( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1730, 1703( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1643( $\nu_{\text{C-C}}$ ), 1454( $\delta_{\text{OH}}$ ), 1375( $\delta_{\text{CH}_3}$ ), 1024( $\nu_{\text{CH}_2\text{OH}}$ ), 873( $\delta_{\text{C=CH}_2}$ ).

На спектре ПМР (рис. П5) имеется синглет протона альдегидной группы в области 9,48 м.д.

### 3.3. Окисление $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 - \text{H}_2\text{SO}_4$ на твердой подложке

#### 3.3.1. Окисление $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 - \text{H}_2\text{SO}_4$ на $\text{Al}_2\text{O}_3$ [35]

Гранулы  $\text{Al}_2\text{O}_3$  обрабатывают бихроматом калия  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$  и серной кислотой  $\text{H}_2\text{SO}_4$  при последовательном добавлении. Бетулин помещают в ацетон и диспергируют в УЗ-ванне до состояния белой суспензии. Окислитель с влажным оксидом алюминия  $\text{Al}_2\text{O}_3$  был добавлен небольшими порциями к бетулину в реакционную смесь. Реакционная смесь перемешивается 1,5 часа, после чего отстаивается, чтобы неорганическая часть выпала в осадок. Неорганический осадок, который составляет соединения хрома Cr(VI), отделяют от реакционной смеси путем декантирования.

В оставшуюся реакционную смесь добавляют избыток воды. Выпадает белый хлопьевидный осадок, который несколько раз промывают горячей водой. Образованию такого осадка, вероятно, способствовало наличие в реакционной смеси ионов алюминия, обладающих хорошей флокулирующей способностью. Гранулы  $\text{Al}_2\text{O}_3$  с плотно прилипшим слоем зеленого цвета, отделенные декантированием, подвергали регенерации. Прибавление воды к гранулам с последующим перемешиванием приводило к образованию раствора ярко зеленого цвета, представляющего собой раствор  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$  и не содержащего органической компоненты. Такой способ позволяет отделить соединения Cr (III) и регенерировать в дальнейшем гранулы оксида алюминия. Вероятно, сорбирующая способность гранул  $\text{Al}_2\text{O}_3$  по отношению к соединениям хрома обусловлена высоким сродством их к кристаллической решётке оксида алюминия.

Ход реакции контролировали методами ТСХ. Время удерживания основного пика на ВЭЖХ (рис. П1) продукта соответствовало времени удерживания основного пика на хроматограмме стандарта бетулоновой кислоты. Максимальный выход продукта составил 84%.

Физико-химические характеристики бетулоновой кислоты соответствовали литературным данным [44]:

$$T_{пл} = 251^{\circ}\text{C}$$

ИК-спектр (рис. П2),  $[\nu] = [\text{см}^{-1}]$ , (KBr): 3410 ( $\nu_{\text{OH}}$ ), 3070 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 2945, 2868 ( $\nu_{\text{C-Has,s}}$ ), 1705 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1642 ( $\nu_{\text{C-C}}$ ), 1457 ( $\delta_{\text{OH}}$ ), 1377 ( $\delta_{\text{CH}_3 \text{ sy}}$ ), 1240, 1201, 1180, 1140, 1115 ( $\nu_{\text{C-O}}$ ), 883 ( $\delta_{\text{C=CH}_2}$ ).

### 3.3.2. Окисление $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 - \text{H}_2\text{SO}_4$ на силикагеле [34]

Гранулы  $\text{SiO}_2$  обработали  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{H}_2\text{SO}_4$  при последовательном добавлении. Тем временем в колбу с бетулином добавили ацетон и диспергировали смесь в УЗ-ванне до образования белой суспензии. Окислитель с «мокрым»  $\text{SiO}_2$  добавляют к суспензии бетулина в реактор. Реакционную смесь перемешивают 10 мин. После этого  $\text{SiO}_2$  удаляют из реакционной смеси и добавляют избыток воды к оставшейся массе. Выпавший в виде белых хлопьев осадок отфильтровали, промыли горячей водой, высушили.

Ход реакции контролировали методами ТСХ. Время удерживания основного пика на ВЭЖХ (рис. П6) продукта соответствовало времени удерживания основного пика на хроматограмме стандарта бетулонового альдегида. Максимальный выход продукта составил 84%.

Физико-химические характеристики бетулонового альдегида соответствовали литературным данным [44]:

$$T_{пл} = 164^{\circ}\text{C}$$

ИК-спектр (рис. П7),  $[\nu] = [\text{см}^{-1}]$ , (KBr): 2941, 2868 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1730, 1703 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1643 ( $\nu_{\text{C-C}}$ ), 1454 ( $\delta_{\text{OH}}$ ), 1375 ( $\delta_{\text{CH}_3}$ ), 1024 ( $\nu_{\text{CH}_2\text{OH}}$ ), 873 ( $\delta_{\text{C=CH}_2}$ ).

### 3.4. Окисление бетулина селенистой кислотой

Бетулин перемешивали при нагревании с селенистой кислотой в 1,4-диоксана в течение 7 суток. Индикатором хода реакции является выпадение селена. По завершении процесса, верхний слой реакционной смеси декантировали и отогнали на роторном испарителе. Полученную маслообразную субстанцию растворяли в элюенте и очищали методом колоночной хроматографии, а затем подвергли перекристаллизации.

Ход реакции контролировали методом ТСХ. Максимальный выход продукта составил 84%.

Физико-химические характеристики бетулонового альдегида [44]:

$$T_{пл} = 220 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

### 3.5. Пробная реакция Ганча

Реакционную смесь, состоящую из бетулонала, ацетилацетона, ацетата аммония и изопропилового спирта нагревали в колбе с обратным холодильником на кипящей водяной бане при температуре 80°C.

Ход реакции контролировали методом ТСХ. Максимальный выход продукта составил 24% после перекристаллизации.

## Заключение

В результате проведенной научно-исследовательской работы можно сделать следующие **выводы**:

1. Отработан метод получения и очистки бетулина из сырья.
2. Исследованы различные реакции получения бетулоналя, бетулоновой кислоты и луп-20(29)-ен-3β,28-диол-30-аля.
3. Оптимизирована хроматографическая методика определения продуктов окисления бетулина, а также метод ТСХ для качественной идентификации продуктов окисления бетулина.
4. Установлены условия образования продуктов окисления бетулина в зависимости от времени реакции, температуры и соотношения бетулин-окислитель (метод ВЭЖХ).

## 5. Список литературы

1. Бореко Е. И., Павлова Н. И., Савинова О. В. Сравнительная противовирусная активность нативных тритерпеноидов //Здравоохранение (Минск). – 2014. – №. 10. – С. 65-68.
2. Покровский А. Г. и др. Синтез производных растительных тритерпенов и исследование их противовирусной и иммуностимулирующей активности //Химия в интересах устойчивого развития. – 2001. – Т. 9. – №. 3. – С. 485-491.
3. Tolstikov G. A. et al. Betulin and its derivatives. Chemistry and biological activity //Chemistry for sustainable development. – 2005. – Т. 13. – №. 1. – С. 1-29.
4. Флехтер О. Б. и др. Синтез и противовирусные свойства производных лупановых тритерпеноидов //Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38. – №. 7. – С. 10-13.
5. Михайленко М. А. и др. Получение и исследование физико-химических свойств сольватов бетулина //Химия растительного сырья. – 2010. – №. 2.
6. Базарнова Ю. Г. Биологическая активность сухого экстракта бересты и его применение в масложировых продуктах //Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». – 2011. – №. 2.
7. Кузнецов Б. Н. и др. Синтез биологически активных тритерпеновых соединений на основе бетулина //Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2011. – Т. 4. – №. 4.
8. Флехтер О. Б. и др. Получение бетулиновой кислоты из экстракта бетулина. Противовирусная и противоязвенная активность некоторых родственных терпеноидов //Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36. – №. 9. – С. 26-28.
9. Андия-Правдивый К. О. Э. и др. Синтез бетулиновой кислоты из бетулина и исследование ее сольubilизации с помощью липосом //Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24. – №. 10.
10. Когай Т. И., Левданский В. А., Кузнецов Б. Н. Способ получения бетулиновой кислоты. – 2005.

11. Ciurlea S. et al. Birch tree outer bark, a natural source of bioactive pentacyclic triterpenes with an antitumor activity // *J Agroalim Proc Technol.* – 2010. – Т. 16. – С. 328-332.
12. Кислицын А. Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение // *Химия древесины.* – 1994. – Т. 3. – С. 3-28.
13. Машковский М. Д. Лекарственные средства. – Новая волна, 2003.
14. Ирисметов М.П., Джиембаев Б.Ж., Арыстанова Т.А., Барамкесова Г.Т. Химия и применение глициризиновой кислоты и ее производных // *Алма-Ата: Гулым,* 2002.
15. Lee K. H., Morris-Natschke S. L. Recent advances in the discovery and development of plant-derived natural products and their analogs as anti-HIV agents // *Pure and applied chemistry.* – 1999. – Т. 71. – №. 6. – С. 1045-1051.
16. Толстиков Г. А., Плясунова О. А., Покровский А. Г. Синтез и фармакологическая активность диникотината бетулина // *Биоорганическая химия.* – 2002. – Т. 28. – №. 6. – С. 543-550.
17. Tolstikova T. G. et al. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* – 2006. – Т. 32. – №. 1. – С. 37-49.
18. Ionescu F. *Phytochemical Investigation of Bursera Arida Family Burseraceae.* – 1974.
19. Kashiwada Y. et al. Synthesis and anti-HIV activity of 3-alkylamido-3-deoxy-betulinic acid derivatives // *Chemical and pharmaceutical bulletin.* – 2000. – Т. 48. – №. 9. – С. 1387-1390.
20. Tang J. J. et al. Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques // *Cell metabolism.* – 2011. – Т. 13. – №. 1. – С. 44-56.
21. Dehaen W., Mashentseva A. A., Seitembetov T. S. Allobetulin and its derivatives: synthesis and biological activity // *Molecules.* – 2011. – Т. 16. – №. 3. – С. 2443-2466.



22. Shukla V. G., Salgaonkar P. D., Akamanchi K. G. A mild, chemoselective oxidation of sulfides to sulfoxides using o-iodoxybenzoic acid and tetraethylammonium bromide as catalyst //The Journal of organic chemistry. – 2003. – T. 68. – №. 13. – С. 5422-5425.
23. Cheng M. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of matrix metalloproteinase inhibitors derived from a modified proline scaffold //Journal of medicinal chemistry. – 1999. – Т. 42. – №. 26. – С. 5426-5436.
24. Yamazaki S. Chromium (VI) oxide-catalyzed benzylic oxidation with periodic acid //Organic Letters. – 1999. – Т. 1. – №. 13. – С. 2129-2132.
25. Терней А. Современная органическая химия: 1 том. – Мир, 1981.
26. Henry J. R., Weinreb S. M. A convenient, mild method for oxidative cleavage of alkenes with Jones reagent/osmium tetroxide //The Journal of Organic Chemistry. – 1993. – Т. 58. – №. 17. – С. 4745-4745.
27. Lou J. D., Wang L. Z. An efficient and selective solvent-free oxidation of alcohols //CHEMICAL PAPERS-SLOVAK ACADEMY OF SCIENCES. – 2003. – Т. 57. – №. 2. – С. 136-138.
28. Corey E. J. et al. Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media. – 1979.
29. Collins J. C., Hess W. W., Frank F. J. Dipyridine-chromium (VI) oxide oxidation of alcohols in dichloromethane //Tetrahedron Letters. – 1968. – Т. 9. – №. 30. – С. 3363-3366.
30. Lee K. H., Morris-Natschke S. L. Recent advances in the discovery and development of plant-derived natural products and their analogs as anti-HIV agents //Pure and applied chemistry. – 1999. – Т. 71. – №. 6. – С. 1045-1051.
31. Jeong H. J. et al. Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 1999. – Т. 9. – №. 8. – С. 1201-1204.
32. Barton D. H. R., Holness N. J. 18. Triterpenoids. Part V. Some relative configurations in rings C, D, and E of the  $\beta$ -amyrin and the lupeol group of triterpenoids //Journal of the Chemical Society (Resumed). – 1952. – С. 78-92.

33. Lawrie W., McLean J., Taylor G. R. 839. Triterpenoids in the bark of mountain ash (*sorbus aucuparia* L.) // *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. – 1960. – С. 4303-4308.
34. Бурлова И. В. и др. Контролируемый синтез бетулонового альдегида окислением бетулина на силикагеле // *Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология*. – 2011. – Т. 54. – №. 11. – С. 46-49.
35. Melnikova N. et al. A practical synthesis of betulonic acid using selective oxidation of betulin on aluminium solid support // *Molecules*. – 2012. – Т. 17. – №. 10. – С. 11849-11863.
36. Komissarova N. G. et al. Selective oxidation of betulin by Cr (VI) reagents // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2002. – Т. 38. – №. 1. – С. 58-61.
37. Яновская Л. А., Юфит С. С. *Органический синтез в двухфазных системах*. – Химия, 1982.
38. Когай Т. Н., Кузнецов Б. Н. Восстановление бетулоновой кислоты в бетулиновую кислоту в условиях межфазного катализа // *Химия растительного сырья*. – 2008. – №. 2.
39. Левданский В. А. и др. *Способ получения бетулина*. – 1999.
40. Попова Н. Р., Боголицын К. Г., Поварницына Т. В. Каталитическое окисление лигнинных веществ с использованием в качестве катализаторов полиоксометаллатов // *Химия растительного сырья*. – 2008. – №. 4.
41. Кожевников И. В. *Успехи в области катализа гетерополикикислотами* // *Успехи химии*. – 1987. – Т. 56. – №. 9. – С. 1417-1443.
42. Firouzabadi H., Iranpoor N., Amani K. Solvent-free and selective oxidation of hydroxy groups to their corresponding carbonyl functions with ferric nitrate activated by heteropoly acids // *Synthesis*. – 2003. – Т. 2003. – №. 03. – С. 0408-0412.
43. Heravi M. M. et al. Keggin-type heteropolyacids-catalyzed one pot oxidation-trimerization of alcohols into 2, 4, 6-trisubstituted-1, 3, 5-trioxanes. – 2009.

44. Csuk R., Schmuck K., Schäfer R. A practical synthesis of betulinic acid //Tetrahedron letters. – 2006. – Т. 47. – №. 49. – С. 8769-8770.
45. Pichette A. et al. Selective oxidation of betulin for the preparation of betulinic acid, an antitumoral compound //Synthetic communications. – 2004. – Т. 34. – №. 21. – С. 3925-3937.
46. Pezzuto J. M., Kim D. S. H. L. Methods of manufacturing betulinic acid : пат. 5804575 США. – 1998.
47. Андия-Правдивый К. О. Э. и др. Синтез бетулиновой кислоты из бетулина и исследование ее солюбилизации с помощью липосом //Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24. – №. 10.
48. Когай Т. И. Улучшенный двухстадийный метод получения бетулиновой кислоты из бетулина //Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2008. – Т. 1. – №. 1.
49. Полуконова Н. В. и др. Химический анализ и способ получения новой биологически активной композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) //Химия растительного сырья. – 2013. – №. 4.
50. Krasutsky P. A., Carlson R. M., Nesterenko V. V. Method for manufacturing betulinic acid : пат. 6232481 США. – 2001.
51. Komissarova N. G. et al. Selective oxidation of betulin by Cr (VI) reagents //Chemistry of Natural Compounds. – 2002. – Т. 38. – №. 1. – С. 58-61.
52. Петренко Н. И. и др. Синтез производных бетулоновой кислоты, содержащих аминокислотные фрагменты //Химия природных соединений. – 2002. – Т. 4. – С. 276-283.
53. Коропачинский И. Ю. и др. Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы: материалы I Между. – 2013.
54. Писарев Д. И., Новиков О. О. Методы выделения и анализа эфирных масел //Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – Т. 18. – №. 10 (129).

55. Катышева А. С. и др. Гидрохимическое осаждение пленок твердых растворов PbSySe1– у: состав, структура, морфология //Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология. – 2012. – Т. 55. – №. 4.
56. Вайсбергер А. и др. Органические растворители. Физические свойства и методы очистки //М.: Изд-во иностр. лит-ры. – 1958.
57. Нигматуллина Л. Р. Синтез новых физиологически активных веществ на основе тритерпеноидов лупанового ряда. – 2002.
58. Петренко Н. И. и др. Синтез производных бетулоновой кислоты, содержащих аминокислотные фрагменты //Химия природных соединений. – 2002. – Т. 4. – С. 276-283.
59. Титце Л., Айхер Т. Препаративная органическая химия: Реакции и синтезы в практикуме органической химии и научно-исследовательской лаборатории: Пер. с нем. – М. : Мир, 1999.
60. Хейнс, А. Методы окисления органических соединений. Алканы, алкены, алкины и арены / А. Хейнс. - М. : Мир, 1988. - 200 с.
61. Хейнс А. Методы окисления органических соединений: Алканы, алкены, алкины и арены: Пер. с англ. – Мир, 1988.
62. Tsuji J. Palladium catalysis in natural product synthesis //Pure and Applied Chemistry. – 1981. – Т. 53. – №. 12. – С. 2371-2378.
63. Hayashi Y. et al. Oxidative Double Bond Cleavage of-Substituted Styrenes with Molecular Oxygen //J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. – 1997. – С. 3291.
64. Denisenko M. V. et al. Oxidation of betulin, dihydrobetulin, and 3 $\beta$ -28-dihydroxy-18-lupene by ruthenium tetraoxide //Chemistry of Natural Compounds. – 1991. – Т. 27. – №. 3. – С. 374-375.
65. Ionescu F. Phytochemical Investigation of Bursera Arida Family Burseraceae. – 1974.
67. Tolstikova T. G. et al. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives //Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2006. – Т. 32. – №. 1. – С. 37-49.

68. Kashiwada Y. et al. Synthesis and anti-HIV activity of 3-alkylamido-3-deoxy-betulinic acid derivatives //Chemical and pharmaceutical bulletin. – 2000. – Т. 48. – №. 9. – С. 1387-1390.
69. Физер, Л. Химия природных соединений фенантренового ряда / Л. Физер, М. Физер; по ред. В.М. Родионова. - ГХИ. Москва - Ленинград, 1953.-656 с.
70. Тафт, Р.У. Пространственные эффекты в органической химии / Р.У. Тафт; под ред. М.С. Ньюмена. - Москва: ИЛ, 1960. - 562 с.
71. Shernyukov A. V. et al. Spirocyclization of 2, 3-seco-19 $\beta$ , 28-epoxy-28-oxo-18 $\alpha$ -olean-2, 3-dicarboxylic anhydride with benzylamines //Doklady Chemistry. – SP MAIK Nauka/Interperiodica, 2009. – Т. 429. – №. 1. – С. 286.
72. Kazakova O. B., Tolstikov G. A., Suponitskii K. Y. A one-step approach to the synthesis of germanicane triterpenoids from allobetulin //Russian journal of bioorganic chemistry. – 2010. – Т. 36. – №. 1. – С. 133-135.
73. Platanov V. G. et al. Triterpenoid antiviral activity against influenza A and B viruses //Pharm. Chem. J. – 1995. – Т. 29. – С. 42-46.
74. Flekhter O. B. et al. Synthesis of betulinic acid from betulin extract and study of the antiviral and antiulcer activity of some related terpenoids //Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2002. – Т. 36. – №. 9. – С. 484-487.
75. Anikina L. V. et al. Effects of lupane and oleanane  $\beta$ -enaminoketones on the number and morphology of white blood cells //Pharmaceutical chemistry journal. – 2009. – Т. 43. – №. 7.
76. Salin O. et al. Inhibitory effect of the natural product betulin and its derivatives against the intracellular bacterium Chlamydia pneumoniae //Biochemical pharmacology. – 2010. – Т. 80. – №. 8. – С. 1141-1151.
77. Flekhter O. B. et al. Synthesis and pharmacological activity of betulin, betulinic acid, and allobetulin esters //Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2005. – Т. 39. – №. 8. – С. 401-404.
78. Tolmacheva I. A., Galaiko N. V., Grishko V. V. Synthesis of acylhydrazones from lupane and 19 $\beta$ , 28-epoxy-18 $\alpha$ -oleanane 2, 3-seco-aldehydonitriles //Chemistry of natural compounds. – 2010. – Т. 46. – №. 1. – С. 39-43.

79. Sharma M. G., Rajani D. P., Patel H. M. Green approach for synthesis of bioactive Hantzsch 1, 4-dihydropyridine derivatives based on thiophene moiety via multicomponent reaction //Royal Society open science. – 2017. – T. 4. – №. 6. – C. 170006.
80. Debache A. et al. An efficient one-step synthesis of 1, 4-dihydropyridines via a triphenylphosphine-catalyzed three-component Hantzsch reaction under mild conditions //Tetrahedron Letters. – 2009. – T. 50. – №. 37. – C. 5248-5250.
81. Zolfigol M. A., Safaiee M. Synthesis of 1, 4-dihydropyridines under solvent-free conditions //Synlett. – 2004. – T. 2004. – №. 05. – C. 0827-0828.
82. Bossert F., Meyer H., Wehinger E. 4-Aryldihydropyridines, a new class of highly active calcium antagonists //Angewandte Chemie International Edition in English. – 1981. – T. 20. – №. 9. – C. 762-769.
83. Shen L. et al. A revisit to the Hantzsch reaction: Unexpected products beyond 1, 4-dihydropyridines //Green Chemistry. – 2009. – T. 11. – №. 9. – C. 1414-1420.
84. Shen L. et al. Ytterbium (III) perfluorooctanoate catalyzed one-pot, three-component synthesis of fully substituted pyrazoles under solvent-free conditions //Synlett. – 2008. – T. 2008. – №. 09. – C. 1341-1344.
85. Ghosh P. Synthesis of bioactive 28-hydroxy-3-oxolup-20(29)-en-30-al with antileukemic activity / P. Ghosh, A. Mandal, J. Ghosh, C. Pal, A. K. Nanda // Journal of Asian Natural Products Research. – 2012. – Vol. 14, Iss. 2. – P. 141– 153.

## Приложение

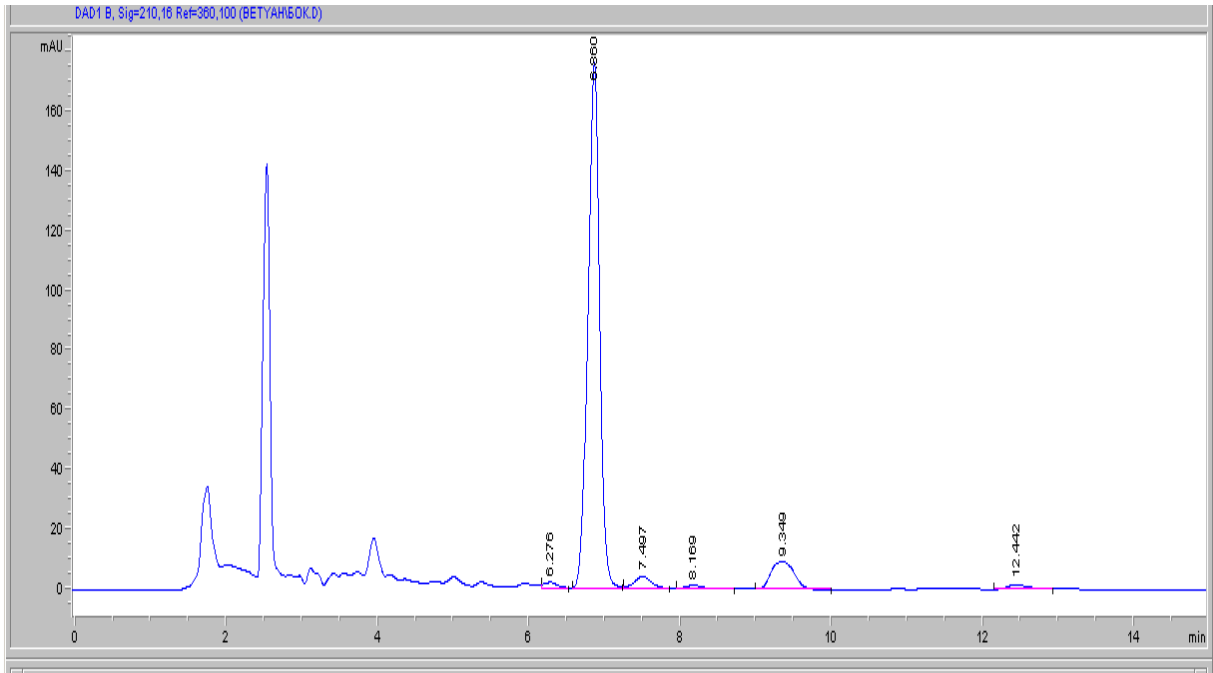


Рисунок П1. Хроматограмма бетулоновой кислоты (5 мг/мл в ПФ (смесь ацетон - ацетонитрил), ВЭЖХ система «Agilent 1100», ДМД,  $\lambda=210$  нм).

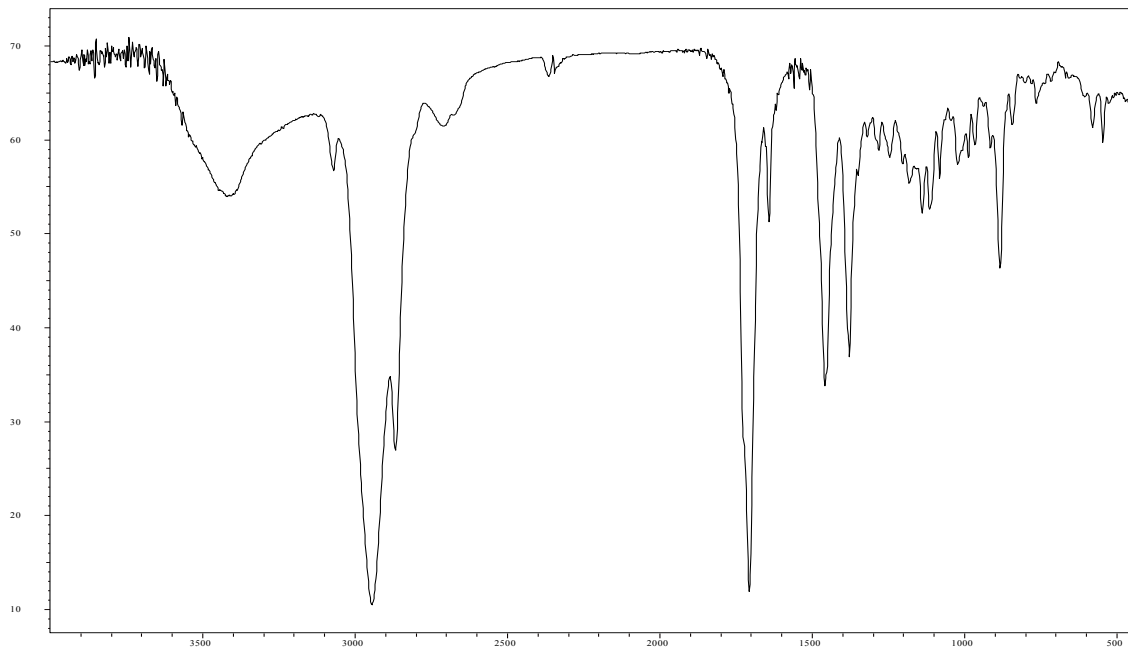


Рисунок П2. ИК-спектр бетулоновой кислоты

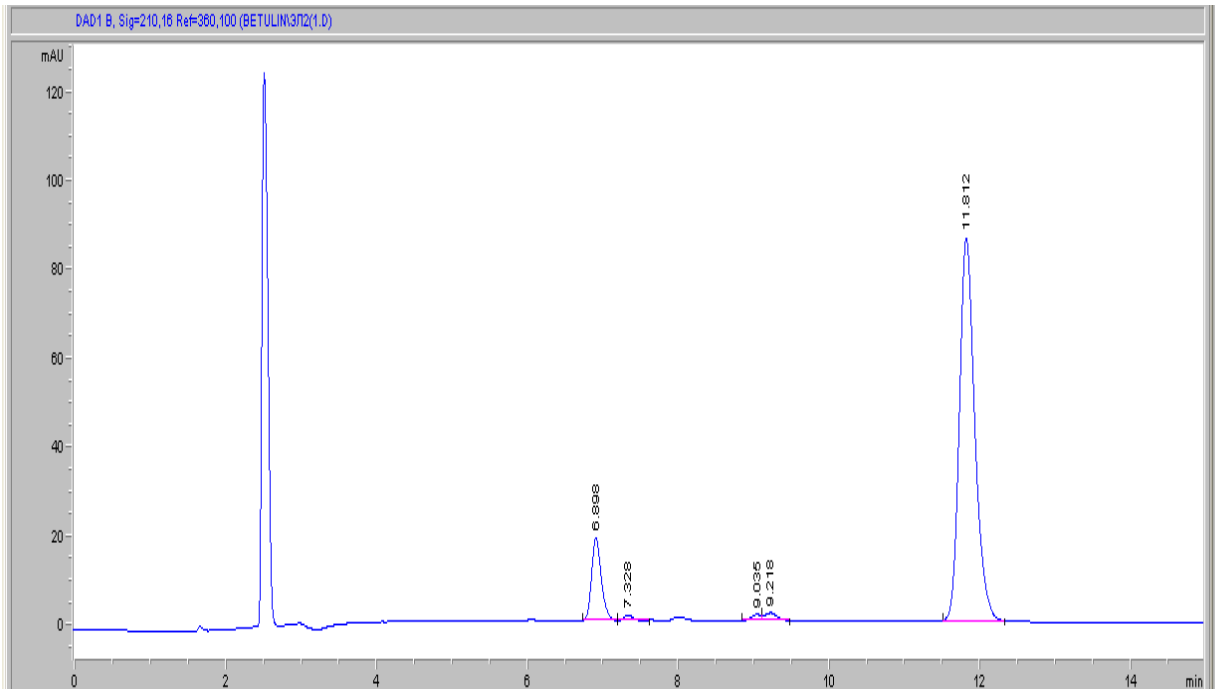


Рисунок П3. Хроматограмма бетулонового альдегида (5 мг/мл в ПФ (смесь ацетон - ацетонитрил), ВЭЖХ система «Agilent 1100», ДМД,  $\lambda=210$  нм).

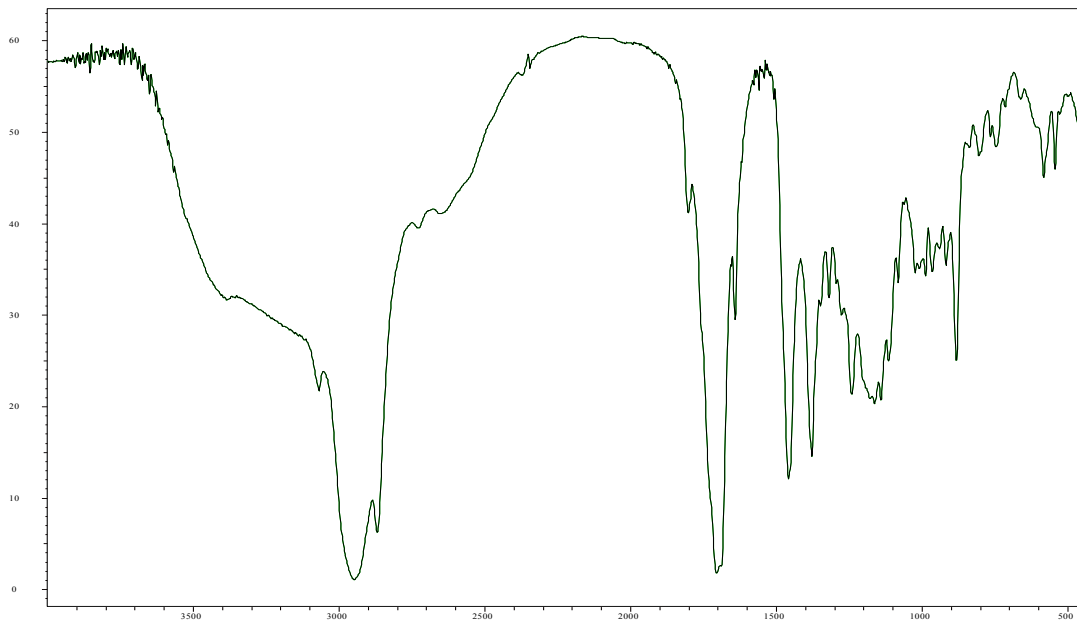


Рисунок П4. ИК-спектр бетулонового альдегида



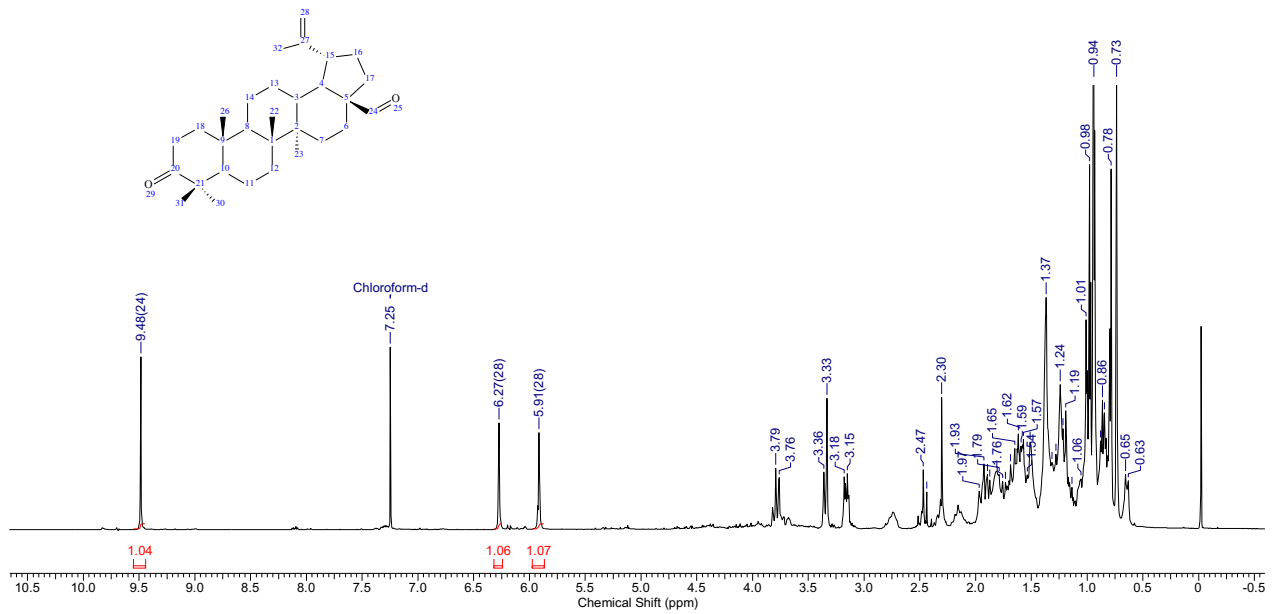


Рисунок П5. ПМР бетулонового альдегида

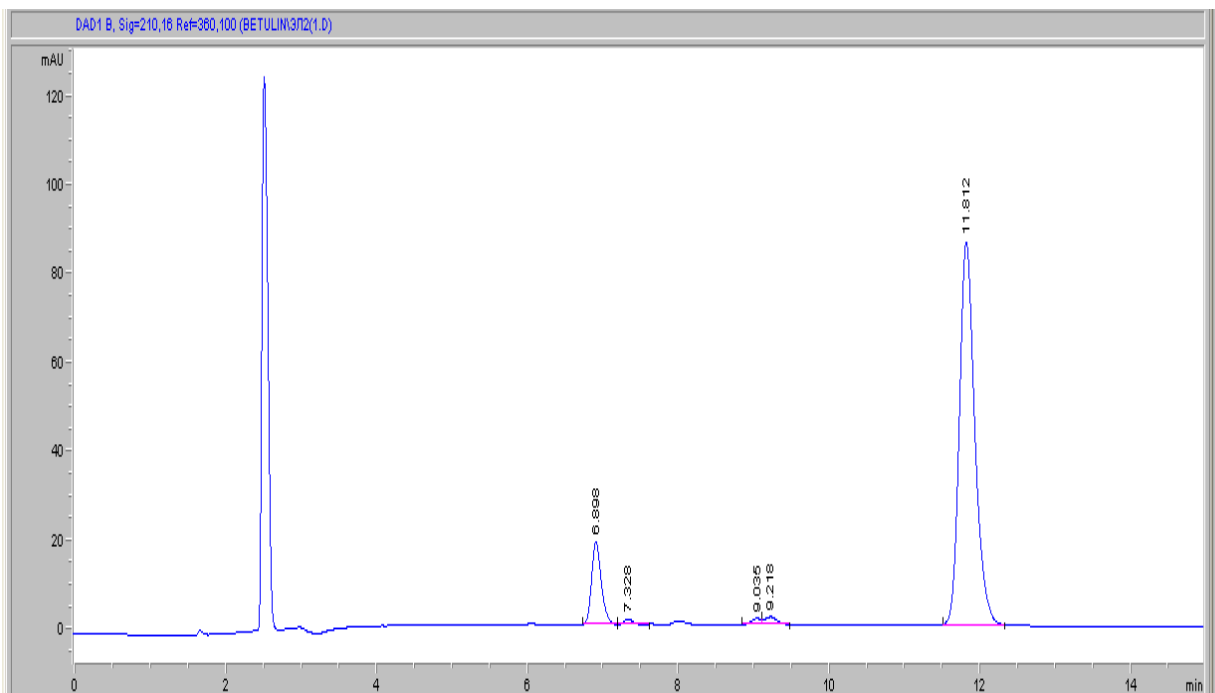
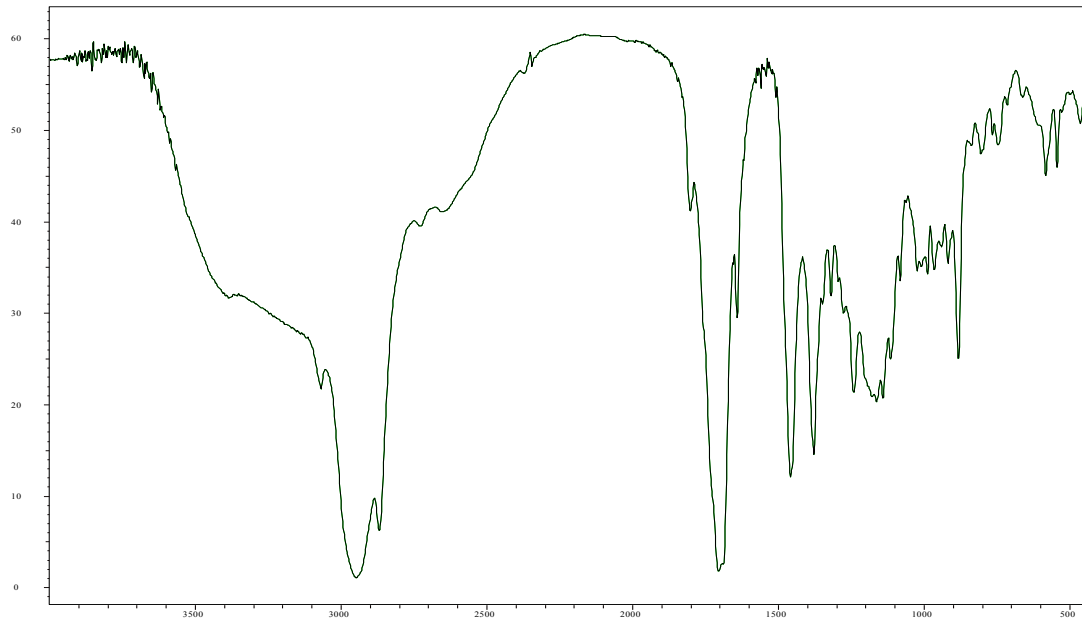


Рисунок Пб. Хроматограмма бетулонового альдегида (5 мг/мл в ПФ (смесь ацетон - ацетонитрил), ВЭЖХ система «Agilent 1100», ДМД,  $\lambda=210$  нм).



*Рисунок П7. ИК-спектр бетулового альдегида*