



УДК 547.597.057-148+615.014.23

## СИНТЕЗ БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ БЕТУЛИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕЕ СОЛЮБИЛИЗАЦИИ С ПОМОЩЬЮ ЛИПОСОМ

© 1998 г. Ле Банг Шон, А. П. Каплун<sup>#</sup>, А. А. Шпилевский, Ю. Э. Андия-Правдивый, С. Г. Алексеева, В. Б. Григорьев\*, В. И. Швец

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова (МИТХТ), 117571, Москва, пр. Вернадского, 86;

\* НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН

Поступила в редакцию 03.03.98 г. Принята к печати 05.06.98 г.

Разработан метод превращения бетулина в бетулиновую кислоту, заключающийся в последовательном окислении бетулина оксидом хрома (VI) до бетулоновой кислоты и восстановлении ее боргидридом натрия. При этом образуется смесь 3-гидроксиэпимеров, в которой содержание природного β-эпимера составляет 85%. Анализ характера изменения интенсивности рассеивания света дисперсиями липосом с различным содержанием бетулиновой кислоты показал, что в липосомы можно включить до 10 мол. % бетулиновой кислоты. Исследована эффективность включения бетулиновой кислоты в липосомы в зависимости от их состава. Показано, что присутствие поливинилпирролидона и Проксанола увеличивает агрегационную стабильность липосомной формы бетулиновой кислоты. Указанные полимеры солюбилизируют бетулиновую кислоту с такой же эффективностью, что и липосомы.

*Ключевые слова:* бетулин; бетулиновая кислота; окисление; липосомы; поливинилпирролидон; Проксанол; солюбилизация.

Недавно было обнаружено, что бетулиновая кислота (3β-гидрокси-20(29)-лупаен-28-овая кислота) (ШВ) подавляет рост меланомы [1] и других раковых клеток нейроэктодермального происхождения [2].

Бетулиновая кислота (ВА) известна довольно давно (впервые она была выделена в 1902 г. под названием гратиолона [3]). Она найдена в коре и листьях многих растений [4–7], но ее выделение малорентабельно из-за низкого содержания (около 0.1% сухого веса). Однако кора березы состоит на 25% из бетулина (I), биосинтетического предшественника бетулиновой кислоты [8]. До недавнего времени было известно четырехстадийное превращение бетулина в бетулиновую кислоту [9], заключающееся в блокировании обеих гидроксильных групп ацелированием, избирательном гидролизе сложноэфирной группы первичного спирта, окислении деблокированной гидроксиметиленовой группы до карбоксильной и окончательном удалении ацетильной защитной группы. Суммарный выход составлял 30%. В то же время очевидно, что подобное превращение

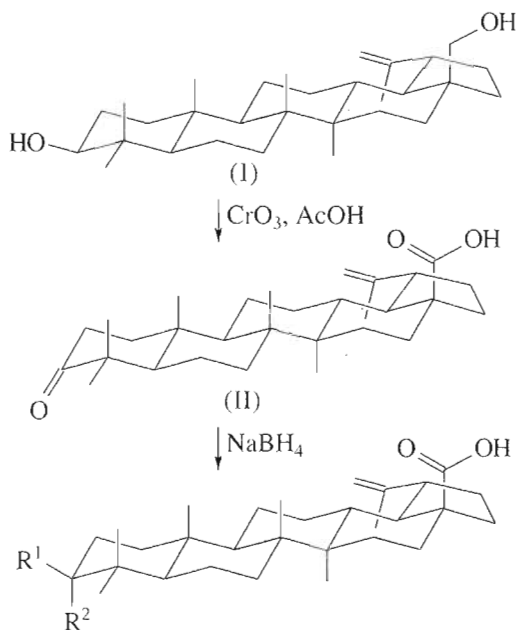
можно осуществить в две стадии: 1) окислением, которое должно привести к бетулоновой кислоте (II), и 2) восстановлением кетогруппы до вторичного гидроксила. Основной целью данной работы была разработка именно такого синтеза.

Бетулиновая кислота практически нерастворима в воде, что очень осложняет ее использование. Поэтому другой нашей целью было исследование возможности солюбилизации ВА с помощью липосом.

В качестве окислителей было опробовано несколько реагентов: перманганат калия [10] в присутствии дибензо-6-краун-12, азотная кислота [11] и хромовый ангидрид [9]. Надежда на избирательное окисление первичной спиртовой группы первыми двумя реагентами не оправдалась. В том и другом случае конверсия исходного бетулина (I) была крайне низкой. В то же время использование хромового ангидрида в 2.2-кратном мольном избытке в уксусной кислоте приводило к полной конверсии бетулина. На ТСХ обнаружилось пятно с большей, чем исходный бетулин, хроматографической подвижностью, окрашивающееся не только реагентом на тритерпеноиды (анисовый альдегид в серной кислоте), но и 2,4-динитрофенилгидразином. Синтезированное вещество выделялось из эфирного экстракта в виде натриевой соли осаждением раствором щелочи. Выход натриевой соли бетулоновой кислоты (II) соста-

Сокращения: ВА – бетулиновая кислота; Chol – холестерин; CholS – холестерин сульфат; ePC – яичный фосфатидилхолин; Na-BA – натриевая соль бетулиновой кислоты; PC – фосфатидилхолин; PVP – поливинилпирролидон; SM – сфингомиелин.

<sup>#</sup> Автор для переписки.



(IIIa)  $\text{R}^1 = \text{H}, \text{R}^2 = \text{OH}$

(IIIb)  $\text{R}^1 = \text{OH}, \text{R}^2 = \text{H}$

(III) – смесь энимеров (IIIa) и (IIIb) в соотношении 15:85

#### Схема

вил 40%. Температура плавления выделенной бетулоновой кислоты (II) соответствовала литературным данным (245–248°C [12, 13]). В дальнейшем условия реакции были оптимизированы: при использовании 4,4-кратного мольного избытка окислителя выход повышался до 59%, причем наилучший эффект был достигнут, когда весь оксид хрома (VI) прибавляли одной порцией.

Вторая стадия заключалась в восстановлении бетулоновой кислоты (II) боргидридом натрия в метаноле. Судя по ТСХ, реакция проходит практически с количественным выходом. Бетулиновую кислоту (IIIb) выделяли осаждением из раствора метанол–спирт (2:1) горячей водой с последующей кристаллизацией из метанола.

Строение бетулоновой (II) и бетулиновой (IIIb) кислот подтверждалось ИК- и  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрами, сравнением их с соответствующими спектрами исходного бетулина (I); для конечного соединения (IIIb) был также получен масс-спектр. Полоса поглощения спиртового гидроксила ( $3500\text{ см}^{-1}$ ) присутствовала в ИК-спектрах бетулина и кислоты (III) (менее интенсивная), но не наблюдалась в спектре бетулоновой кислоты (II). Спектр последней содержал плохо разрешенные полосы с волновыми числами 1687 и  $1703\text{ см}^{-1}$ , которые соответствовали карбонильному поглощению карбоксила и кетогруппы. В спектре же кислоты (III) наблюдалась только полоса ( $1690\text{ см}^{-1}$ ), характер-

ная для карбоксильной группы. Очень широкая полоса, соответствующая колебаниям  $\text{OH}$  карбоксильной группы ( $3200\text{--}2800\text{ см}^{-1}$ ), присутствовала в спектрах кислот (II) и (IIIb).

Из  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров обсуждаемых веществ (I)–(III) также хорошо видны изменения, произошедшие в их структуре в ходе превращений. Основная часть протонов тритерпеноидного скелета резонирует в интервале 2.0–0.73 м.д. В этой же области для всех трех веществ наблюдаются шесть синглетов, соответствующих метильным протонам. Сигналы с  $\delta > 2.0$  м.д. дают надежную информацию о различиях в строении соединений (I)–(III). В этой области спектра хорошо различимы несколько групп сигналов. Сигналы двух протонов концевой двойной связи (4.71 и 4.59 м.д.) характерны для всех трех веществ, что свидетельствует об устойчивости этой связи к окислению в выбранных условиях. Сигналы протонов C28-гидроксиметиленовой группы (3.1–3.25 м.д.) присутствуют только в спектре бетулина (I), в то время как сигналы при C3 наблюдаются в спектрах бетулина (I) и кислоты (III). В последнем случае кроме мультиплета при 3.17 м.д., совпадающего по химическому сдвигу и форме с аналогичным сигналом в спектре бетулина (I), присутствовал мультиплет при 3.37 м.д., который мы отнесли к экваториальному протону  $\alpha$ -эпимера (IIIa) [14]. Соотношение интегральных интенсивностей указанных мультиплетов составило 85:15. После перекристаллизации из метанола более слабopольный мультиплет не наблюдался.

Нам также удалось идентифицировать еще один сигнал. Он присутствует во всех трех спектрах, причем в спектрах кислот (II) и (III) его химический сдвиг практически одинаков (2.99 и 3.00 м.д.), а в спектре бетулина (I) он располагается в более сильном поле (2.36 м.д.). Мы предположили, что это сигнал метиленового протона при C19. С одной стороны, это аллильный протон, и поэтому он сдвинут в сторону более слабого поля по отношению к большинству протонов, с другой – этот сигнал существенно меняет свое расположение у кислот (II) и (III) по сравнению с бетулином (I), что легко объяснимо как следствие 1,3-диаксиального взаимодействия с C28-карбоксильной группой. Для подтверждения наличия взаимодействия рассматриваемого протона с протонами при двойной связи были дополнительно измерены спектры двойного резонанса. При облучении образца бетулиновой кислоты (IIIb) частотой, резонансной для рассматриваемого мультиплета, ширина сигналов протонов при двойной связи уменьшалась в 1.3–1.5 раза, что является следствием устранения спин-спинового взаимодействия данных протонов с протоном при C19. Это свидетельствует о том, что сигналы принадлежат взаимосвязанным протонам.

Основной недостаток разработанного метода превращения бетулина (I) в бетулиновую кислоту (IIIb) – неполная стереоселективность восстановления кетогруппы. В нашем случае по данным <sup>1</sup>H-ЯМР-спектра соотношение β-(IIIb) и α-(IIIa) эпимеров до перекристаллизации составляло 85:15. С помощью перекристаллизации можно полностью удалить неприродный α-эпимер (IIIa), что легко обнаружить с помощью <sup>1</sup>H-ЯМР-спектра.

Во время подготовки рукописи к печати появилось сообщение об аналогичном синтезе бетулиновой кислоты (IIIb) из бетулина (I) [15], осуществленном в лаборатории, в которой впервые была продемонстрирована антимеланомная активность бетулиновой кислоты [1]. Отличия заключаются в нескольких других условиях окисления и в проведении восстановления бетулиновой кислоты (II) в тетрагидрофуране. В тетрагидрофуране стереоселективность превращения выше (соотношение β:α-эпимеров составило 95:5), чем при использовании метанола.

Важным фактором, во многом определяющим эффективность действия гидрофобных лекарственных веществ, является возможность получения их “водорастворимых” форм. Для решения этой проблемы могут быть применены несколько подходов: использование смесей растворителей (чаще всего диметилсульфоксида или спирта) с водой, получение производных (в том числе и солей) гидрофобных веществ с полярными партнерами, получение соединений включения с циклодекстринами и их производными, образование комплексов с амфифильными полимерами (например, с PVP) и включение исследуемых веществ в состав наночастиц (липосом и жировых эмульсий). На наш взгляд, наиболее приемлемым является последний вариант, поскольку при этом используются нормальные компоненты организма человека (полярные липиды и триглицериды). Так как ВА (III) практически нерастворима в маслах, мы остановились на липосомной форме.

Таким образом, целью второй части работы был поиск состава липосом, наилучшим образом сольбилизирующих ВА. На первом этапе мы определили максимальное содержание ВА, которое может “встроиться” в мембрану липосом из ePC. Водные дисперсии смесей ePC и ВА с различным мольным соотношением готовились впрыскиванием спиртового раствора ePC и тритерпеноида в физиологический раствор при 60°C. Конечная концентрация липидов выбиралась таким образом, чтобы оптическое поглощение дисперсий за счет рассеивания света при 450 нм не превышало 0.5.

ВА и ее натриевая соль при впрыскивании спиртового раствора в воду образуют очень нестабильные дисперсии. Агрегаты микрокристаллов осаждались из дисперсии в течение часа. Поэтому мы предполагали, что при достижении кон-

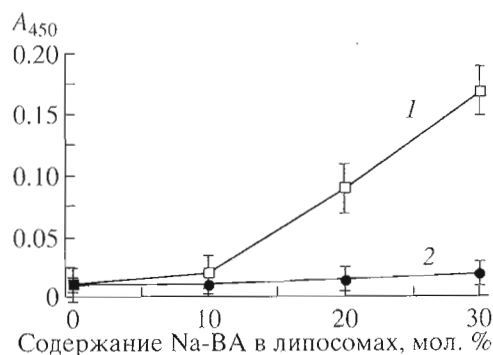
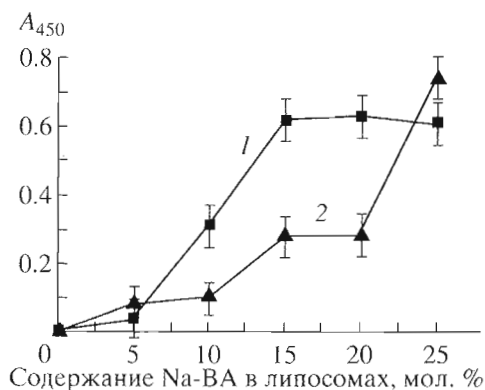


Рис. 1. Поглощение дисперсий ePC и Na-BA с различной мольной долей Na-BA: через 5 мин после приготовления (1) и после центрифугирования в течение 30 мин при 4300 g (2). Суммарная концентрация ингредиентов 0.5 мг/мл.

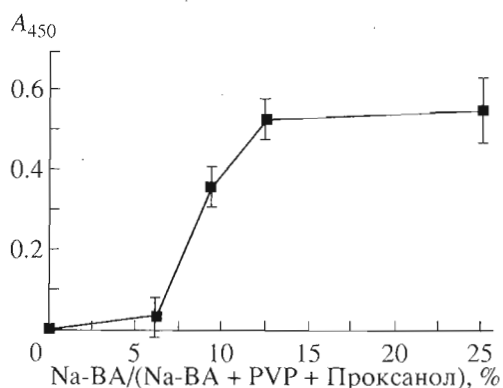
центрации “насыщения” ВА в бислое она будет выделяться в виде подобных микрокристаллов, что должно проявляться в резком увеличении светорассеивания и выпадении осадка при центрифугировании. На рис. 1 представлено изменение поглощения дисперсий до и после центрифугирования в зависимости от содержания Na-BA в липосомах из ePC. Оптическое поглощение дисперсии до центрифугирования (кривая 1), начиная с препаратов, содержащих более 10% Na-BA, возрастало скачкообразно. Кривая 2 представляет результаты аналогичных измерений тех же дисперсий после центрифугирования. Сравнение этих кривых показывает, что при мольной доле Na-BA более 10% образуются частицы, осаждающиеся при центрифугировании (4300 g), т.е. значительно более крупные, чем липосомы. Этот осадок был легко различим визуально.

Целью следующей серии экспериментов была оптимизация состава липосом. Сравнивалась агрегационная устойчивость липосомных дисперсий, содержащих по 10 мол. % Na-BA в смеси с различными полярными липидами. Липосомы в данном случае готовились по методике [16], модифицированной нами. Преимущество этого метода заключается в быстроте и полноте диспергирования липидной пленки. При использовании традиционной методики возникали сложности, связанные с тем, что кристаллы ВА с большим трудом отделялись от стенки колбы даже при получасовом встряхивании. Для создания изотоничности мы выбрали глюкозу, так как было обнаружено, что в 0.9% солевом (физиологическом) растворе наблюдается быстрая агрегация липосом при хранении.

Агрегационную устойчивость оценивали по соотношению значений оптического поглощения до и после центрифугирования. Для смесей ВА с ePC, с гидрированным соевым PC, с CholS, а также для тройных смесей с ePC/Chol (5:2) и с



**Рис. 2.** Поглощение дисперсий ePC/Na-BA (1) и ePC/CholS/Na-BA (2) с различной мольной долей Na-BA. Общая концентрация везде 5 мг/мл. Соотношение Na-BA/CholS = 1/1 (моль/моль).



**Рис. 3.** Поглощение при 450 нм дисперсий, содержащих Na-BA, PVP и Проксанол 268 при различной массовой доле Na-BA. Суммарная концентрация ингредиентов составляла 3 мг/мл.

SM/Chol (5:2) это соотношение было 2 и более, тогда как для дисперсий, составленных из BA и SM или SM/CholS/BA (5:2:1), ePC/CholS/BA (5:2:1) это соотношение варьировало от 1.05 до 1.1.

Из приведенных данных видно, что стабильность дисперсий, включающих BA, в большой степени зависит от природы полярной головки липида. Например, гидрированный соевый PC имеет в гидрофобной части цепи, мало отличающиеся от таковых в SM из мозга крупного рогатого скота, однако SM показывает лучшие результаты. В то же время оба исследуемых PC, различающиеся и по длине, и по ненасыщенности жирнокислотных остатков, одинаково плохо солюбилизируют BA. Это положение еще более наглядно выявляется при сравнении Chol и CholS. Chol снижает агрегационную устойчивость липосом на основе ePC, а CholS повышает ее. Последнее хорошо иллюстрируется данными, представленными на рис. 2. Аналогичным образом Chol и CholS влияют на устойчивость липосом на основе SM.

На электронных микрофотографиях липосомных препаратов на основе смеси ePC/CholS, выполненных через неделю после их получения, наблюдаются конгломераты, состоящие из 10–20 липосом, а также пучки игольчатых кристаллов длиной 0.5–2 мкм (по всей видимости, это кристаллы BA). Чтобы избежать этого нежелательного явления, были испытаны амфифильные полимеры для стабилизации липосом. Известно, что амфифильные полимеры способны предотвращать агрегацию наночастиц [17]. Мы предполагали, что в нашем случае полимеры также будут покрывать липосомы, защищая их от агрегации. Обнаружено, что наилучший результат достигается при использовании смеси полимеров PVP (*M* 12800 Да)/Проксанол 268: электронная микрофотография показала отсутствие агрегации в течение месяца и сохранение размеров липосом в диапазоне 30–100 нм. Не наблюдается и образование кристаллов BA в этих дисперсиях.

Как было отмечено выше, PVP и некоторые другие полимеры используются для солюбилизации гидрофобных соединений [18–20]. Поэтому мы исследовали эффективность подобной солюбилизации в случае BA для сравнения с эффективностью солюбилизации липосомами. Смесь полимеров, показавшая наилучшие результаты для стабилизации липосом, максимально солюбилизировала BA в количестве 6.7% суммарной массы полимеров (рис. 3). Это практически не отличается от эффективности солюбилизации с помощью липосом (6.6%). Тем не менее мы отдаем предпочтение липосомам, так как липиды, входящие в их состав, являются обычными компонентами человеческого организма, и, следовательно, менее опасны, чем синтетические полимеры. Если планировать использование BA в антиканцерогенных препаратах, то следует принять во внимание еще один довод в пользу липосом. Известно, что липосомы из-за своих размеров не проникают через поры капилляров и, следовательно, имеют меньший объем распределения. С одной стороны, это уменьшает токсичность инкапсулированного вещества, а с другой – закладывает основу для “пассивного нацеливания” липосомных препаратов в области с перфорированными капиллярами, каковыми обычно являются капилляры, снабжающие кровью солидные опухоли [21].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бетулин (т.пл. 256–257°C) выделен из коры березы на кафедре лесохимических продуктов и биологически активных веществ Лесотехнической академии (Санкт-Петербург). Яичный PC (с индексом окисленности менее 0.2), SM из мозга крупного рогатого скота и Проксанол 268 были получены от предприятия “Биолек” (Харьков).

Гидрированный соевый РС (Lipoid S 100-3) любезно предоставила фирма Lipoid KG (Германия). Холестеринсульфат (т.пл. 148–150°C) синтезирован по известной методике [22, 23]. PVP (*M* 12800 Да) любезно предоставила фирма BASF (Германия). Остальные реактивы фирм SIGMA и ALDRICH использовали без дополнительной очистки.

Оптическое поглощение дисперсий при 450 нм определяли на спектрофотометре DU-6 (Beckman, США). Масс-спектры сняты на масс-спектрометре МСВХ (SELMI, г. Сумы, Украина) с ионизацией осколками деления  $^{252}\text{Cf}$  при использовании времяпролетного анализатора ионов; ускоряющее напряжение 20 кВ, расстояние между образцами и детектором – 45 см; количество распадов  $^{252}\text{Cf}$  (стартов) – 25000, что соответствует времени накопления около 5 мин. ИК-спектры регистрировали на приборе Hitachi 270-30 data processor (Япония) в области 800–3600  $\text{см}^{-1}$  в вазелиновом масле. Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР регистрировали на приборе Bruker MSL-200 (ФРГ) в дейтерохлороформе при рабочей частоте 200.13 МГц. Химические сдвиги ( $\delta$ ) приведены в миллионных долях относительно  $\text{Me}_4\text{Si}$ .

ТСХ осуществляли на пластинках “Сорбтон Диол” (Хромдет-Экология, Россия) в системе хлороформ–метанол–муравьиная кислота (100:2:0.5). Тритерпеноиды обнаруживали на пластинках с помощью реактива, содержащего анисовый альдегид [24]; этот реагент был модифицирован нами (*para*-анисовый альдегид 1.85 мл, спирт 95 мл, серная кислота 7.5 мл, уксусная кислота 0.75 мл). Для обнаружения карбонилсодержащих веществ использовали спиртовой раствор 2,4-динитрофенилгидразина.

Липосомы озвучивали с помощью дезинтегратора Cole-Parmer 8890 (Cole-Parmer instrument company, США).

Электронные микрофотографии получали с помощью электронного микроскопа Joel 100S (Япония) при инструментальном увеличении 20 тыс. Дисперсию липосом наносили на форвар-углеродные подложки, контрастировали 2% уранилацетатом и высушивали на воздухе. Размеры частиц определяли в 10 полях наблюдения. Для расчета истинного размера липосом по данным электронных микрофотографий видимые размеры частиц умножали на коэффициент равный 0.866 (предполагается, что при высушивании липосом образуются полусферы [25]).

### Бетулиновая кислота (IIIb)

**Окисление бетулина (I).** 15 г (34 ммоль) бетулина (I) смешивали с 600 мл ледяной уксусной кислоты и помещали на водяную баню с температурой 15–20°C. К смеси одной порцией прибавляли раствор 15 г (150 ммоль)  $\text{CrO}_3$  в 26 мл уксусной

кислоты и 22 мл воды при перемешивании и постоянной температуре. При этом весь бетулин растворяется. Через 10 мин к реакционной смеси прибавляли 600 мл 10% раствора NaCl. Продукты реакции экстрагировали эфиром (2 × 600 мл). Эфирный экстракт промывали (4 × 500 мл) 10% NaCl. К эфирному экстракту прибавляли 500 мл 10% NaCl и 300 мл 4 н. раствора NaOH. При слабом встряхивании выпадает хлопьевидный осадок на границе раздела фаз (натриевая соль бетулоновой кислоты). Через 1 ч водный слой удаляли, эфирный раствор декантировали и к оставшемуся осадку в делительную воронку прибавляли по 600 мл эфира и 10% NaCl, смесь тщательно встряхивали, давали разделиться эфирному и водному слоям, водный, эфирный и промежуточный слои разделяли и каждый фильтровали. Осадки объединяли и сушили в вакууме в присутствии пятиоксида фосфора. Затем кристаллы растворяли в 400 мл метанола, фильтровали через слой силикагеля (толщиной 2 см) для удаления следов соединений хрома, и фильтрат упаривали. Получали 9.53 г (59%) натриевой соли бетулоновой кислоты (II).

100 мг натриевой соли кетокислоты (II) смешивали в делительной воронке с 50 мл эфира и 20 мл 10% соляной кислоты, встряхивали до полного растворения кристаллов, эфирный слой отделяли, промывали водой, сушили сульфатом натрия и упаривали. Остаток кристаллизовали из спирта. Получали белые кристаллы с т. пл. 245–248°C (по литературным данным, т. пл. бетулоновой кислоты 246–247°C [12, 13],  $R_f$  0.45; ИК-спектр ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 3200–2800 (ОН в COOH), 1703 (C=O в RCOR), 1687 (C=O в COOH).  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр: 4.71 (1H, м, =CH<sub>2</sub>), 4.59 (1H, м, =CH<sub>2</sub>), 2.99 (1H, м, 19-CH), 1.67 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 1.04 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.89 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.88 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.80 (3H, с, CH<sub>3</sub>).

### Восстановление бетулоновой кислоты (II).

К раствору бетулоновой кислоты (II) (9.43 г, 20.0 ммоль) в 400 мл метанола при перемешивании прибавляли порциями 1 г  $\text{NaBH}_4$  (26.45 ммоль) в течение 10 мин. Затем подкисляли 50 мл 10% соляной кислоты, разбавляли 100 мл горячей воды и охлаждали до 20°C. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали на фильтре водой (6 × 50 мл) и сушили в эксикаторе над пятиокисью фосфора. Кристаллы растворяли при нагревании в смеси 1 л метанола и 500 мл этанола, быстро прибавляли 500 мл горячей воды и оставляли остывать на воздухе (около 2 ч). Осадок отфильтровывали и сушили в эксикаторе. К фильтрату добавляли еще 500 мл воды, осадок отфильтровывали и сушили. Данную операцию повторяли, и осадки объединяли. Получили 8.58 г (95%) кислоты (III) в виде белых кристаллов; т.пл. 291–293°C (ср. т.пл. бетулиновой кислоты 292–293°C [26]);  $R_f$  0.31; ИК-спектр ( $\nu$ ,  $\text{см}^{-1}$ ): 3500 (ОН в C<sub>2</sub>ОН), 3300–2800 (ОН в COOH), 1690 (C=O в COOH);

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектр ( $\delta$ , м.д.): 3.37 (0.15H, м, 3-H $\beta$ ), 3.17 (0.85H, м, 3-H $\alpha$ ), 4.71 (1H, м, =CH<sub>2</sub>), 4.59 (1H, м, =CH<sub>2</sub>), 3.00 (1H, м, 19-CH), 1.67 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 1.23 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.95 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.80 (3H, с, CH<sub>3</sub>), 0.73 (3H, с, CH<sub>3</sub>).

Перекристаллизация из метанола дала белые игольчатые кристаллы бетулиновой кислоты (IIIb); т.пл. 295–298°C. В <sup>1</sup>H-ЯМР-спектре сигналов, соответствующих  $\alpha$ -эпимеру (IIIa) (при  $\delta$  3.37 м.д.), не наблюдалось, MS,  $m/z$ : 456.7 [M]<sup>+</sup>.

**Приготовление липосом. Способ 1** [27]. Спиртовой раствор (0.2 мл) липидов и Na-BA в суммарной концентрации 5 мг/мл быстро впрыскивали в 2 мл 0.9% раствора NaCl через тонкую иголку при 60°C и интенсивном перемешивании. Полученную суспензию озвучивали при 50°C в течение 10 мин.

**Способ 2** [16]. Водный раствор глюкозы (5%, 3 мл) упаривали в круглодонной колбе до получения аморфной стекловидной пленки. В колбу прибавляли 3 мл спиртового раствора липидов и Na-BA с суммарной концентрацией 5 мг/мл и снова упаривали. В колбу вносили 3 мл дистиллированной воды и тщательно взбалтывали. Суспензию подвергали обработке ультразвуком как описано выше.

**Приготовление липосом с BA и полимерами.** Смесь полимеров PVP и Проксанола 268 растворяли в спирте вместе с липидами и Na-BA и далее обрабатывали как описано в способе 2.

**Исследование эффективности включения Na-BA в липосомы из ePC.** Образцы дисперсий липосом из ePC и Na-BA готовили по способу 1 с разной мольной долей Na-BA (от 0 до 30%). Оптическое поглощение препаратов измеряли при 450 нм, затем их центрифугировали (4300 г, 30 мин) и повторно измеряли оптическое поглощение.

**Исследование влияния состава липосом на их агрегационную устойчивость.** Липосомы с различным липидным составом и содержанием Na-BA 10 мол. % готовили по способу 2. Использовали следующие составы: ePC; гидрированный соевый PC; ePC/Chol (5/2 моль/моль); ePC/CholS (5/2 моль/моль); SM; SM/Chol (5/2 моль/моль); SM/CholS (5/2 моль/моль). Оптическое поглощение препаратов измеряли при 450 нм, затем их центрифугировали (4300 г, 30 мин) и оптическое поглощение измеряли повторно.

**Исследование способности солюбилизации Na-BA полимерами.** Смесь PVP, Проксанола 268 и Na-BA (1:1 по массе) растворяли в спирте, так чтобы суммарная концентрация ингредиентов составляла 3 мг/мл. Водный раствор глюкозы (5%, 3 мл) упаривали в круглодонной колбе до получения аморфной стекловидной пленки. В колбу прибавляли 3 мл спиртового раствора смеси полимеров с Na-BA и снова упаривали. Затем вносили 3 мл дистиллированной воды и тщательно

взбалтывали. Суспензию подвергали обработке ультразвуком как описано выше.

Для уменьшения числа измерений образцы готовили следующим образом. Получали дисперсии с содержанием Na-BA в смеси 0.0 и 25.0 массовых %. Измеряли их оптическую плотность. Так как второй образец показывал значительное поглощение, готовили следующий с массовой долей Na-BA средней между предыдущими (12.5%) и проводили измерение. И так до тех пор, пока оптическое поглощение не становилось менее 0.1. Последний образец готовили с массовой долей Na-BA, равной среднему значению двух предыдущих.

Мы выражаем благодарность фирме BASF за предоставление образцов полимеров и фирме Lipoid KG за образец гидрированного соевого фосфатидилхолина.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pisha E., Chai H., Lee I.S., Chagwedera T.E., Fransworth N.R., Cordell G.A., Beecher C.W., Fong H.H., Kinghorn A.D., Brown D.M., Wani M.C., Wall M.E., Hieken T.J., Das Gutta T.K., Pezzuto J.M. // Nat. Med. 1995. V. 1. P. 1046–1051.
2. Fulda S., Friesen C., Los M., Scaffidi C., Mier W., Benedict M., Nuñez G., Kramer P.H., Peter M.E., Debatin K.M. // Cancer Res. 1997. V. 57. P. 4956–4964.
3. Retzlaff B. // Ar. 1902. V. 240. P. 561–567.
4. Trumbull E.R., Bianchi E., Eckert D.J., Wiedhopf R.M., Cole J.R. // J. Pharm. Sci. 1976. V. 65. P. 1407–1408.
5. Ogura M., Cordell G.A., Fransworth N.R. // Lloydia. 1977. V. 40. P. 157–168.
6. Kingston D.G.I., Munjal R.C. // Lloydia. 1978. V. 41. P. 499–500.
7. Hernandez-Perez M., Lopez-Garcia R.E., Rabanal R.M., Darias V., Arias A. // J. Ethnopharmacol. 1994. V. 41. P. 115–119.
8. Ruzicka L., Brungger R., Gustus H. // Helv. 1932. V. 15. P. 634–640.
9. Ruzicka L., Lamberton A.H., Christle C.W. // Helv. Chim. Acta. 1938. V. 21. P. 1706–1717.
10. Хиккинботтом В. Реакции органических соединений. М.: ГОНТИ НКТП, 1939. С. 125.
11. Луанг П. // Синтез органических препаратов / Ред. Б.А. Казанский. М.: ИЛ, 1952. Сб. 3. С. 411.
12. Pakrashi S.C., Bhattacharyya J., Mookerjee S., Samanta T.B. // Phytochemistry. 1968. V. 7. P. 461–466.
13. Krajniak E., Ritchie E., Taylor W.C. // Aust. J. Chem. 1969. V. 22. P. 1331–1332.
14. Shoolery J.N., Rogers M.T. // J. Am. Chem. Soc. 1958. V. 80. P. 5121–5135.
15. Darrick S.H.L. Kim, Chen Z., Nguyen V.T., Pezzuto J.M., Qiu S., Lu Z.Z. // Syn. Comm. 1997. V. 27. P. 1607–1612.
16. Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 238–245.
17. Muller R.H., Maassen S., Schwarz C., Mehnert W. // J. Contr. Rel. 1997. V. 47. P. 261–269.

18. Keipert S., Voigt R. // Pharmazie. 1986. V. 41. P. 400–404.
19. Adel M.S., Geneidi A.S., Ali Shoukri R., Saad I. // Pharmazie. 1997. V. 52. P. 373–375.
20. Yonish-Rouach E., Shinitzky M., Rubinstein M. // J. Immunol. Methods. 1990. V. 135. P. 147–153.
21. Gregoriadis G. // Trends Biotechnol. 1995. V. 13. P. 527–537.
22. Sobel A., Spoerri P. // J. Am. Chem. Soc. 1941. V. 63. P. 1259–1262.
23. Sobel A., Spoerri P. // J. Am. Chem. Soc. 1942. V. 64. P. 361–363.
24. Kritchevsky D., Martak D.S., Rothblat G.H. // Anal. Biochem. 1963. V. 5. P. 388–396.
25. Drechsler M., Banchmann D., Brandl M. // Abstracts of Fourth Liposome Research Days Conference (Freiburg, Germany). 1995. P. 80.
26. Fujioka T., Kashiwada Y., Kiluskie R.E., Consentino L.M., Ballas L.M., Jiang J.B., Janzen W.P., Chen L.S., Lee K.H. // J. Nat. Prod. 1994. V. 57. P. 243–247.
27. Batzri S., Korn E.D. // Biochim. Biophys. Acta. 1973. V. 298. P. 1015–1019.

## The Synthesis of Betulinic Acid from Betulin and Its Solubilization with Liposomes

Le Bang Son\*, A. P. Kaplun\*<sup>#</sup>, A. A. Shpilevskii\*, Yu. E. Andiya-Pravdivyi\*,  
S. G. Alekseeva\*, V. B. Grigor'ev\*\*\*, and V. I. Shvets\*

\*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernagskogo 86, Moscow, 117571 Russia

\*\*Ivanovskii Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Gamalei 16, Moscow, Russia

A method for betulinic acid synthesis from betulin was developed. Betulin was oxidized with chromium oxide (VI) into betulonic acid, which was reduced with sodium borohydride to yield a mixture of 3-hydroxy epimers containing 85% of the natural  $\beta$ -epimer. Studying changes in light scattering by dispersions of liposomes with different contents of betulinic acid revealed that up to 10 mol % of this compound may be entrapped in liposomes. The dependence of the efficiency of the betulinic acid entrapment on liposome composition was studied. The presence of polyvinylpyrrolidone or Proxanol increased the resistance of betulinic acid-containing liposomes to aggregation. These polymers solubilized betulinic acid with the same efficiency as liposomes.

*Key words:* betulin, betulinic acid, oxidation, liposomes, polyvinylpyrrolidone, Proxanol, solubilization

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed.