

В. А. Андрияшина, Т. С. Стыценко, Н. В. Карпова,
В. В. Ядерец, В. В. Джавахия*

ПОЛУЧЕНИЕ ЭФИРОВ СТЕРИНОВ РАСТИТЕЛЬНОГО И ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ КАК КЛЮЧЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДЛЯ СИНТЕЗА ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОНА

ФГБУ ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Россия, 117312, Москва
* e-mail: andryushina@rambler.ru

Получена серия эфиров холестерина и β -ситостерина, которые в дальнейшем могут быть использованы для проведения ферментативного расщепления боковой цепи при С17-стероидного ядра до дегидроэпиандростерона с помощью культур микобактерий.

Ключевые слова: эфиры холестерина и β -ситостерина; ортомуравьиный эфир; аprotонный растворитель; минеральная кислота; дегидроэпиандростерон; ЯМР ^1H спектроскопия.

Прастерон или дегидроэпиандростерон (ДГЭА, 3β -гидроксиандроста-5-ен-17-он) привлекает все большее внимание исследователей благодаря своим уникальным физиологическим свойствам. Являясь метаболическим предшественником андрогенов и эстрогенов, данный стероидный гормон принимает участие в обеспечении гомеостаза в организме и участвует в регуляции таких жизненно важных процессов, как размножение, половое влечение, память, мышечная сила, физическая выносливость и др. [1–3]. Среди множества прочих оказываемых терапевтических эффектов воздействие ДГЭА рассматривают в таких аспектах, как замедление процесса старения и предупреждение развития сопутствующих заболеваний (диабет, болезни Паркинсона и Альцгеймера), профилактика развития раковых заболеваний и болезней сердца [4]. Поэтому поиск эффективных способов получения ДГЭА является чрезвычайно актуальной задачей.

Из литературы известно как о химических, так и микробиологических способах получения ДГЭА. Большинство химических способов основано на использовании в качестве исходного сырья ацетата дегидропрегненолона (АДП), получаемого из растительного сырья диоскорея и паслена птичьего [5, 6]. Несмотря на то, что этот способ используется в промышленном производстве, он достаточно трудоемок и основан на использовании токсичных соединений, таких как хлорокись фосфора, что создает большой риск безопасности производства и угрозу окружающей среде. Кроме того, в связи с наблюдаемым в последнее время дефицитом указанного выше растительного сырья, актуальным становится способ получения ДГЭА из более дешевого и доступного вида растительного сырья — стеринов растительного и животного происхождения, тем более, что в России фитостерин может быть получен в неограниченном количестве из отходов лесопереработки. В этом случае возможны 2 варианта синтеза: химический способ через андростендион (АД) [7–9] или микробиологический — непосредственно из стеринов. Микробиологиче-

ские методы в стероидном синтезе всегда предпочтительнее вследствие своей селективности и экологичности, однако в данном случае для осуществления процесса получения ДГЭА из стеринов растительного и животного происхождения необходимо решить проблему эффективного отщепления боковой цепи стеринов при сохранении Δ^5 -двойной связи и гидроксильной группы в С3-положении [10]. Согласно литературным данным, при блокировании любыми способами действия фермента 3β -гидрокси- Δ^5 -стероиддегидрогеназы и последующем отщеплении боковой цепи возможно микробиологическое получение ДГЭА из стеринов [11, 12]. Для защиты гидроксильной группы при С3, обеспечивающей сохранение двойной связи в кольце В при С5-С6, и дальнейшей конверсии молекулы до ДГЭА могут быть использованы эфиры стеринов животного и растительного происхождения (рисунок) [10].

В настоящее время эфиры холестерина привлекают внимание благодаря недавно обнаруженным терапевтическим свойствам в отношении ряда заболеваний, трудно поддающихся лечению, например, таких как онкологические и сердечно-сосудистые [13]. Ранее значение сложных эфиров холестерина с жирными кислотами было недооценено поскольку считалось, что холестерин имеет тенденцию способствовать заболеваниям коронарных и периферийных артерий. С другой стороны, известно, что холестерин является одним из важнейших составляющих человеческого организма и абсолютно необходим для нормального образования клеточных мембран и синтеза половых гормонов, а эфиры холестерина составляют большую часть частиц липопротеинов низкой плотности, которые циркулируют в крови. Кроме того, исследования последних лет показали, что эфиры холестерина обладают многими уникальными физиологическими свойствами, делающими их незаменимыми при лечении таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера, шизофрения, диабет, нейропатия, ретинопатия и др., проблема лечения которых далеко не решена. В этом плане особый инте-

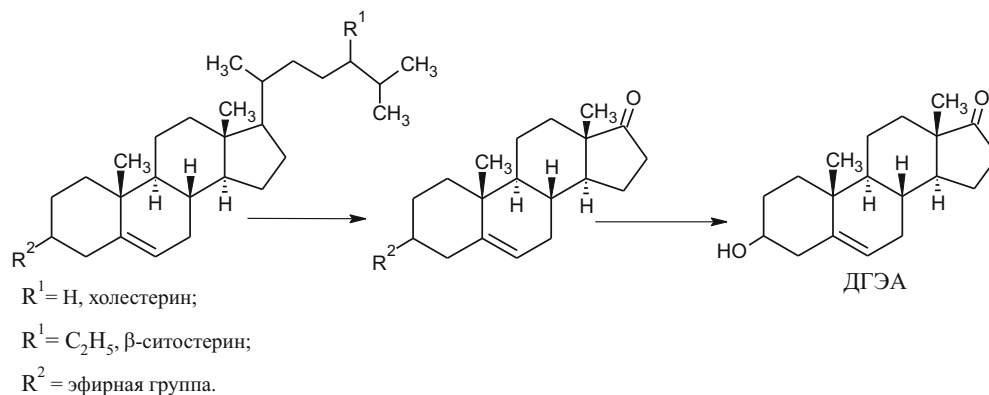


Схема получения ДГЭА из эфиров холестерина и β -ситостерина.

рес представляют эфиры холестерина с ненасыщенными жирными кислотами, такими как гамма-линоленовая кислота, дигомо-гамма-линоленовая кислота и эйкозапентаеновая кислота, которые сами по себе нужны для обеспечения жизнедеятельности здоровых тканей, являются важнейшим компонентом клеточных мембран, а также предшественником простагландина E_1 (PGE_1), являющегося антитромботическим, противовоспалительным, сосудорасширяющим и снижающим содержание холестерина средством. Установлено, что эфиры холестерина с жирными кислотами являются особенно эффективным средством доставки жирных кислот в раковые клетки и атеросклеротические ткани [13]. Кроме того, обнаружено, что сложные эфиры холестерина являются необычайно стабильными и устойчивыми к окислению: гораздо более устойчивы, чем сами жирные кислоты или их соли, триглицериды или другие производные, что делает их незаменимыми для использования в медицинских целях.

Широкое использование эфиры стероидов получили также в лекарственных формах и в пищевых добавках в качестве средств, нарушающих всасывание в кишечнике поступающего с пищей холестерина за счет вытеснения его из мицелл желчной кислоты [14].

В связи со столь широким спектром физиологической активности эфиров холестерина и большим спросом на них на фармацевтическом рынке актуальным является поиск оптимального способа получения этих соединений.

Наш интерес к способу получения эфиров стероидов объясняется возможностью их использования для микробиологического синтеза ДГЭА, поскольку наличие заместителя при С3-положении стероидного ядра позволяет сохранить двойную связь в кольце В стероидного ядра.

Целью данной работы явилось получение стабильных и нетоксичных для микроорганизмов эфиров по С3-положению стероидного ядра молекулы холестерина и β -ситостерина для проведения ферментативного расщепления боковой цепи при С17-положении стероидного ядра культурами микробактерий.

Несмотря на разнообразие описанных в литературе методов получения эфиров стероидов [13 – 18], различаются они, в основном, используемыми для этерифи-

кации стероидов катализаторами, растворителями, кислотами, условиями проведения процесса и выделения продукта.

В качестве основных условий реакций получения эфиров стероидов могут быть приведены следующие:

- взаимодействие холестерина с хлорангидридами или бромангидридами жирных кислот в присутствии подходящего основания, например пиридина, в инертном растворителе, например дихлорметане, в интервале температур 0 – 50 °С;

- взаимодействие холестерина с жирными кислотами в присутствии каталитического количества подходящей минеральной кислоты, например, *n*-толуолсульфокислоты, в инертном растворителе, который образует с водой азеотропную смесь, т.е. толуоле, ксилоле, в температурном интервале от 100 до 180 °С;

- взаимодействие холестерина с жирными кислотами в присутствии конденсирующего средства, например, дициклогексилкарбодиимида, сильного ненуклеофильного основания, например, диметиламинопиридина, в подходящем инертном растворителе, например, дихлорметане, при температуре 10 – 40 °С;

- взаимодействие стерина с триэтилортоформиатом или триметилортоформиатом в органическом растворителе в токе инертного газа в присутствии катализатора — 70 % хлорной кислоты.

В последнее время появились публикации с описанием методов получения эфиров стероидов для их использования в пищевой или медицинской промышленности, в которых не используются растворители, а взаимодействие стероидов с кислотами проводят при высоких температурах (150 – 200 °С) в присутствии катализаторов, например, бисульфата натрия в вакууме в течение длительного времени и в присутствии достаточного количества обесцвечивающего агента, предпочтительно активированного угля [19].

Несмотря на кажущуюся экзотичность способа, он пригоден для крупномасштабного производства эфиров с высоким выходом и позволяет отказаться от использования органических растворителей или минеральных кислот, при этом образуется ограниченное количество побочных продуктов. С учетом имеющихся литературных данных нами были усовершенствованы и оптимизированы способы получения некоторых

простых и сложных эфиров холестерина и β -ситостерина с целью использования их в трансформации до ДГЭА.

Экспериментальная часть

Анализ продуктов трансформации осуществляли с помощью методов ТСХ и ЯМР ^1H . Температуру плавления измеряли капиллярным методом на приборе OptiMelt, MPA-100, США.

Спектры ЯМР ^1H зарегистрированы на приборах Bruker WM-300 (300 МГц) в CDCl_3 , δ .

Метилловый эфир холестерина (3 β -метокси-5-холестен).

Метод 1. К суспензии 5 г холестерина в 5 мл сухого бензола при перемешивании прибавляют 3,5 мл метилортоформиата (МОФ) и 2 капли 57 % HClO_4 . Холестерин полностью растворяется и через 2 ч реакция заканчивается. Кислоту нейтрализуют 30 % спиртовым раствором NaOH , добавляют 50 мл воды и экстрагируют 50 мл бензола. Бензол упаривают досуха, к осадку прибавляют 20 мл ацетона и охлаждают. Затем осадок отфильтровывают и сушат. Получают 5,1 г осадка, который растворяют при перемешивании при температуре 20 °С в 100 мл этилацетата. Нерастворившуюся часть отфильтровывают, этилацетатный фильтрат упаривают. Выпавший осадок отфильтровывают, сушат. Получают 4,82 г (90,4 %) метилового эфира холестерина. $T_{\text{пл}}$ 86 – 87 °С. ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 0,7 (с, 3H, 18- CH_3), 0,97 (с, 3H, 19- CH_3), 3,08 (м, 1H, 3H), 3,36 (с, 3H, OCH_3), 5,38 (с., 1H, 6H).

Метод 2. К суспензии 4 г холестерина в 5 мл сухого бензола при перемешивании прибавляют 3,0 мл МОФ и 2 капли конц. H_2SO_4 . Контроль за реакцией осуществляют методом ТСХ на СГ в системе ацетон — гексан (1:2). Реакция завершается только через 96 ч при 20 °С. Кислоту нейтрализуют 5 каплями 30 % спиртового раствора NaOH , добавляют 20 мл воды и экстрагируют 30 мл бензола. Бензольный слой отделяют, обрабатывают активированным углем, растворитель упаривают досуха, прибавляют 30 мл ацетона. Суспензию охлаждают 2 ч при 4 °С. Осадок отфильтровывают, сушат. Получают 3,96 г осадка, который растворяют при перемешивании при температуре 20 °С в 100 мл этилацетата. Нерастворившуюся часть отфильтровывают, этилацетатный фильтрат упаривают, полученный осадок отфильтровывают, сушат. Получают 3,75 г (85 %) метилового эфира холестерина, $T_{\text{пл}}$ 87 °С, идентичного по ЯМР ^1H спектру метилового эфиру холестерина, полученного в аналогичном опыте.

Метод 3. К суспензии 2,5 г холестерина в 4 мл хлористого метилена при перемешивании прибавляют 3,0 мл МОФ и 2 капли 57 % HClO_4 . Холестерин полностью растворяется, через 2 ч реакция заканчивается. Кислоту нейтрализуют 30 % спиртовым раствором NaOH , добавляют 25 мл воды и экстрагируют 25 мл хлористого метилена. Растворитель упаривают досуха, к осадку прибавляют 10 мл ацетона и охлаждают, осадок отфильтровывают, сушат. Получают 2,07 г

осадка, который растворяют при перемешивании при температуре 20 °С в 50 мл этилацетата. Нерастворившуюся часть отфильтровывают, этилацетатный фильтрат упаривают. Выпавший осадок отфильтровывают, сушат. Получают 2,4 г (90,4 %) метилового эфира холестерина. $T_{\text{пл}}$ 86 – 87 °С. ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 0,7 (с, 3H, 18- CH_3), 0,97 (с, 3H, 19- CH_3), 3,08 (м, 1H, 3H), 3,36 (с, 3H, OCH_3), 5,38 (с., 1H, 6H).

Метилловый эфир β -ситостерина получают взаимодействием 4 г β -ситостерина с 3 мл МОФ в 5 мл сухого бензола в присутствии 2 капель 57 % HClO_4 в течение 2 ч при комнатной температуре по методу 1. Выход 4,01 г (90 %). $T_{\text{пл}}$ 95 – 97 °С. ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 0,68 (с, 3H, 18- CH_3), 0,98 (с, 3H, 19- CH_3), 3,08 (м, 1H, 3H), 3,35 (с, 3H, OCH_3), 5,38 (д, 1H, 6H).

По методу 2 из 4 г β -ситостерина в 5 мл сухого бензола с 3 мл МОФ в присутствии 2 капель концентрированной H_2SO_4 получают 3,67 г (85,8 %) метилового эфира β -ситостерина, идентичного по ЯМР ^1H спектру метилового эфиру β -ситостерина, полученного по методу 1. $T_{\text{пл}}$ 95 – 97 °С.

Этиловый эфир холестерина получают взаимодействием 4 г холестерина с 4 мл триэтилортоформиата (ТОФ) в 5 мл сухого бензола в присутствии 2 капель конц. H_2SO_4 по методу 2. После обработки через 5 сут при 20 °С получают 3,84 г (86,3 %) этилового эфира холестерина. $T_{\text{пл}}$ 90 – 93 °С. ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 0,7 (с, 3H, 18- CH_3), 1,01 (с, 3H, 19- CH_3), 1,2 (с, $\text{CH}_3\text{-OCH}_2$), 3,14 (м, 1H, 3H), 3,53 (м, 2H, OCH_2), 5,35 (д, 1H, 6H).

По методу 1 из 4 г холестерина в 5 мл сухого бензола с 4 мл ЭОФ и 2 капель 57 % HClO_4 через 2 ч после обработки выделяют 3,96 г (89,1 %) этилового эфира холестерина, идентичного по ЯМР ^1H спектру этиловому эфиру холестерина, полученному ранее. $T_{\text{пл}}$ 91 – 93 °С.

Этиловый эфир β -ситостерина получают взаимодействием 4 г β -ситостерина с 5 мл ЭОФ в 5 мл сухого бензола в присутствии 3 капель конц. H_2SO_4 . Через 5 сут при 20 °С реакционную массу обрабатывают по методу 2. Получают 3,5 г (82 %) этилового эфира β -ситостерина. $T_{\text{пл}}$ 72 – 74 °С. ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м.д.: 0,67 (с, 3H, 18- CH_3), 1,0 (с, 3H, 19- CH_3), 1,2 (с, $\text{CH}_3\text{-OCH}_2$), 3,3 (м, 1H, 3H), 3,53 (м, 2H, OCH_2), 5,35 (д, 1H, 6H).

По методу 1 из 4 г холестерина в 5 мл сухого бензола с 5 мл ЭОФ и 3 капель 57 % HClO_4 через 2 ч после обработки выделяют 3,6 г (84,3 %) этилового эфира холестерина, идентичного по ЯМР ^1H спектру ранее полученному. $T_{\text{пл}}$ 72 – 74 °С.

Триметилацетат холестерина. К суспензии 2 г холестерина в 6 мл сухого ацетона и 4 мл пиридина при перемешивании и 20 °С прибавляют 2,4 мл пивалоилхлорида. При этом температура поднимается до 35 °С. При самоохладении до 20 °С перемешивают 2 ч. Реакционную массу охлаждают до (0 + 4) °С и прибавляют при перемешивании 5 мл воды, а затем 20 мл 1 % раствора HCl . Перемешивают 1 ч при 20 °С, выпавший осадок отфильтровывают, промывают 10 мл воды, сушат до постоянной массы. Получают 2,1 г

(86,8 %) триметилацетата холестерина. $T_{пл}$ 154–155 °С. ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м.д.: 0,68 (с, 3H, 18- CH_3), 1,01 (с, 3H, 19- CH_3), 1,18 (с, 9H, 3- CH_3), 4,58 (м, 1H, 3H), 5,35 (д, 1H, 6H).

Триметилацетат β -ситостерина. В условиях, аналогичных получению триметилацетата холестерина, из 2 г β -ситостерина получают 1,92 г (79 %) триметилацетата β -ситостерина. $T_{пл}$ 147–148 °С. ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м.д.: 0,68 (с, 3H, 18- CH_3), 1,01 (с, 3H, 19- CH_3), 1,18 (с, 9H, 3- CH_3), 4,62 (м, 1H, 3H), 5,38 (д, 1H, 6H).

Капроновый эфир холестерина. К суспензии 2 г холестерина в 6 мл сухого ацетона и 4 мл пиридина при перемешивании и температуре 20 °С прибавляют 2,4 мл гексаноилхлорида. При этом температура поднимается до 37 °С. При самоохладении до 20 °С перемешивают 2 ч. Реакционную массу охлаждают до 0 °С и прибавляют при перемешивании 5 мл воды, а затем 20 мл 1 % раствора HCl. Перемешивают 1 ч при 20 °С, выпавший осадок отфильтровывают, промывают 10 мл воды, сушат до постоянной массы. Получают 1,87 г (74,8 %). $T_{пл}$ 93–96 °С. ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м.д.: 0,67 (с, 3H, 18- CH_3), 1,02 (с, 3H, 19- CH_3), 2,3 (м, 2H, OCH_2), 4,62 (м, 1H, 3H), 5,38 (д, 1H, 6H).

Капроновый эфир β -ситостерина. В условиях, аналогичных получению капронового эфира холестерина, из 2 г β -ситостерина получают 1,56 г (63 %) капроновый эфир β -ситостерина. $T_{пл}$ 76–78 °С. ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м.д.: 0,68 (с, 3H, 18- CH_3), 1,02 (с, 3H, 19- CH_3), 2,3 (м, 2H, OCH_2), 4,62 (м, 1H, 3H), 5,38 (д, 1H, 6H).

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных экспериментальных работ найдены условия получения эфиров стерина с высоким выходом при действии ортомуравьиных эфиров на исходные стерин в среде апротонного растворителя в присутствии катализатора — минеральной кислоты. При использовании каталитических количеств серной кислоты реакция протекает в течение 3–5 сут, с хлорной кислотой время сокращается до 2 ч.

В синтезе сложных эфиров стерина реакцию проводили в ацетоне с добавлением пиридина. Процесс протекает с самопроизвольным подъемом температуры от 20 до 37 °С с достаточно высокой скоростью и без образования побочных продуктов. Уже через 30 мин реакция проходит на 80 % и полностью заканчивается через 2 ч. Использовали следующие хлорангидриды: пивалоилхлорид, гексаноилхлорид и триметилхлорсилан.

Триметилхлорсилан реагирует еще более активно. Через 30 мин реакция проходит полностью, но образовавшийся силиловый эфир не устойчив и через 2 ч содержит 15–20 % исходного продукта, а через 2 сут полностью переходит в исходный стерин.

Данные методы могут быть использованы для получения эфиров стерина растительного и животного происхождения как перспективных интермедиатов получения ДГЭА микробиологическим способом.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. M. Traish, H. P. Kang, F. Saad, A. T. Quay, *J. Sex. Med.*, **8**(11), 2960–2982 (2011).
2. О. А. Зейналов, В. А. Андрияшина, К. Г. Скрябин, *Рос. хим. ж.*, **XLIX**(1), 118–124 (2005).
3. Н. П. Гончаров, Г. В. Кацья, *Андрология и генитальная хирургия*, № 1, 13–22 (2015).
4. R. R. Watson(ed.), *DHEA in human health and aging*, CRS press, New York (2012).
5. Патент Китая 102212099А (2011).
6. Патент Китая 102603839А (2012).
7. Патент России 2015154473А, *Бюл. изобрет.*, № 18 (2017).
8. Патент Китая 102603841 (2012).
9. Патент Китая 105503985В (2016).
10. P. Zhou, Y. Fang, H. Yao, et al., *Appl. Biochem. Biotech.*, **186**(2), 496–506 (2018).
11. Патент Китая 104232673А (2014).
12. Патент Китая 107267418А (2017).
13. Патент России 2142468, *Бюл. изобрет.*, № 36 (1999).
14. Патент США 5502045 (2004).
15. Патент США 3684657 (1972).
16. Патент СССР 697053, *Бюл. изобрет.*, № 41 (1979).
17. Патент СССР 980628, *Бюл. изобрет.*, № 45 (1982).
18. Патент СССР 941385, *Бюл. изобрет.*, № 25 (1982).
19. Патент России 2230750, *Бюл. изобрет.*, № 17 (2004).

Поступила 21.06.19

STEROLS OF PLANT AND ANIMAL ORIGIN: KEY INTERMEDIATES FOR THE SYNTHESIS OF DEHYDROEPIANDROSTERONE

V. A. Andryushina*, T. S. Stytsenko, N. V. Karpova, V. V. Yaderets, and V. V. Dzhavakhiya

Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology," Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

* e-mail: andryushina@rambler.ru

A series of cholesterol and β -sitosterol esters have been obtained for subsequently carrying out enzymatic cleavage of the side chain at the C17 steroid nucleus to dehydroepiandrosterone using mycobacterium cultures.

Keywords: cholesterol ester; β -sitosterol ester; orthoformic ester; aprotic solvent; mineral acid; dehydroepiandrosterone; 1H NMR spectroscopy.