

## «ONE-ROT»-МЕТОД ТРАНСФОРМАЦИИ АПОРФИНОВОГО РАСТИТЕЛЬНОГО АЛКАЛОИДА БОЛДИНА В ФЕНАНТРЕНОВЫЙ СЕКО-БОЛДИН В СУБКРИТИЧЕСКОЙ ВОДЕ

©2019 г. **А. В. Лекарь, Е. В. Максименко, С. Н. Борисенко, С. С. Хизриева, Н. И. Борисенко\*, В. И. Минкин**

*Научно-исследовательский институт физической и органической химии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия*

\*boni@ipoc.rsu.ru

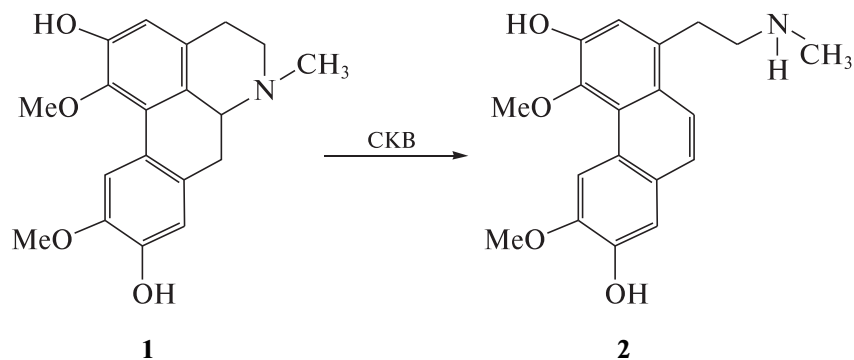
Поступила в редакцию 16.10.2019 г. Прошла рецензирование 01.11.2019 г.  
Принята к публикации 01.11.2019 г.

Предложен «one-rot»-метод получения фенантренового секо-болдина из апорфинового растительного алкалоида болдина в среде субкритической воды (СКВ). Метод, изученный в интервале 100–230 °С, обеспечивает количественный выход секо-болдина за один этап в течение 30 мин без использования каких-либо каталитических добавок. Строение полученного продукта подтверждено методами ЯМР- и масс-спектрометрии. Предложенная техника не требует использования дорогих и зачастую токсичных органических растворителей и позволяет перейти к созданию экологически чистой и недорогой технологии производства секо-болдина в среде СКВ с целью получения новых лекарственных форм.

**Ключевые слова:** «one-rot», апорфиновые алкалоиды, болдин, фенантреновые алкалоиды, секо-болдин, субкритическая вода, ВЭЖХ, ЯМР.

### ВВЕДЕНИЕ

Традиционными объектами синтетической модификации фармацевтически значимых вторичных растительных метаболитов являются многочисленные алкалоиды. Для изучения возможностей синтетической трансформации алкалоидов в среде СКВ (воды, находящейся в жидком состоянии в диапазоне от 100 до 374 °С и давлении до 21,8 МПа) в работе в качестве модельного объекта выбран растительный апорфиновый алкалоид болдин (**1**) (рис. 1), который относится к изохинолино-



**Рис. 1.** Формулы исследуемых соединений: болдин (**1**) и секо-болдин (**2**)

вым алкалоидам апорфиновой подгруппы и извлекается из многолетнего растения *Болдо Пеумус*— *Peumus boldus* Molina. Растение *Болдо Пеумус* культивируется в Южной Америке, на побережье Средиземного моря и Черноморском побережье Кавказа. В коре и листьях растения обнаружены более 17 различных алкалоидов [1], основным из которых является апорфиновый болдин (**1**).

Экстракты листьев и коры растения используются в народной медицине стран Латинской Америки и Средиземноморья и признаются как лекарственное средство рядом фармакопей [2]. Молекула болдина (**1**) содержит фенольные гидроксигруппы и метоксигруппы в каждом из его двух ароматических колец, определяющие его высокую антиоксидантную активность, которая у экстракта растения *Болдо Пеумус*, содержащего болдин, в шесть раз выше, чем активность катехина [3]. Кроме этого, чистый болдин (**1**) демонстрирует широкий спектр физиологически активных свойств, обусловленных, как полагают, его способностью поглощать свободные радикалы различного происхождения: цитопротекторные [4], противоопухолевые [5], иммуномодуляторные [6], гепатопротекторные, противовоспалительные [7] и антидиабетические [8].

Недавно продемонстрировано [9], что болдин (**1**) и его фенантреновый изомер (**2**) проявляют антиацетилхолиновую активность, а также ингибируют альфа-глюкозидазы, что может быть использовано при лечении сахарного диабета второго типа.

Исследования взаимосвязи структуры и активности данного класса соединений [10, 11, 12] показали, что присутствие фенольных циклов в молекуле алкалоида имеет решающее значение для усиления его антиоксидантной активности. Кроме того найдено, что алкалоиды, имеющие фенантреновый скелет, более активны, чем соответствующие им (с теми же заместителями) алкалоиды со скелетом апорфина. Однако, алкалоиды, имеющие фенантреновый скелет, встречаются в мире растений значительно реже, чем апорфиновые алкалоиды [13].

В этой связи разработка недорогих и экологически чистых методов получения фенантреновых алкалоидов из апорфиновых алкалоидов, широко представленных в растительном мире, может открыть перспективу создания многочисленных лекарственных препаратов, обладающих новыми биологически активными свойствами, в том числе, за счет их более высокой антиоксидантной активности по сравнению с апорфиновыми алкалоидами. С другой стороны, следует отметить, что получение фенантреновых алкалоидов в таких реакциях сопровождается полной ароматизацией поликонденсированной системы и образованием флюоресцирующих продуктов, которые могут найти применение в производстве новых материалов, как для фармацевтики, так и для электронных устройств. Флюоресценция фенантреновых алкалоидов, демонстрирующих сильные антиоксидантные свойства, позволяет в перспективе использовать их для разработки недорогих диагностических маркеров [14], базирующихся на регистрации дисбаланса в антиоксидантной системе при патологических состояниях организма.

Разработаны многочисленные синтетические и полусинтетические методы получения некоторых алкалоидов, а в ряде случаев осуществлен взаимный переход между различными типами алкалоидов. В недавних работах [15, 16] изучено получение фенантренового алкалоида секо-глауцина из апорфинового глауцина в среде СКВ [17]. В этом температурном интервале значительно изменяются такие важнейшие физико-химические характеристики воды, как константа диэлектрической проницаемости, поверхностное натяжение, вязкость, константа ионизации. С ростом температуры первые три параметра уменьшаются, тогда как константа

ионизации воды увеличивается и достигает максимума (на три порядка выше) в области 230—270 °С. Вода при таких температурах ведет себя подобно полярному органическому растворителю и при этом может выступать как кислотный или щелочной катализатор, с одной стороны, так и как растворитель — с другой. Уникальной особенностью СКВ, как растворителя, является способность восстанавливать значения указанных выше характеристик до обычных величин при охлаждении воды до комнатной температуры. Это означает, что, охладив до комнатной температуры СКВ, мы получаем среду, которая имеет такую же способность растворять целевые вещества, какую эта вода имела до нагревания. Все это открывает широчайшие перспективы для использования СКВ в экстракции и синтезе новых производных из вторичных растительных метаболитов, поскольку позволяет избежать использования дорогостоящих, а зачастую и токсичных и/или пожароопасных органических растворителей, а также исключить этапы очистки [18]. Сочетание свойств воды как наиболее экономически доступного и экологически чистого растворителя и реагента открывает путь к освоению новой методики получения секо-болдина из болдина в среде СКВ.

С другой стороны, в настоящее время в рамках концепции «зеленой химии» наблюдается лавинообразный рост числа исследований, посвященных разработке методов и процедур так называемой «one-pot»-техники (техники «одного горшка») [19]. Последняя относится к процессам, включающим ряд отдельных реакций, проводимых последовательно в одном реакционном сосуде для получения целевого продукта без выделения и очистки промежуточных продуктов после каждой стадии. Этот подход очень привлекателен, поскольку позволяет избежать длительного процесса разделения и очистки промежуточных химических соединений, экономит время и ресурсы. Ранее [16, 17] для конверсии широко распространенного изохинолинового алкалоида глауцина в его фенантроновый изомер секо-глауцин было предложено использовать СКВ [15].

Цель работы — разработка и применение метода конверсии/трансформации апорфинового алкалоида болдина (**1**) ([S]-2,9-дигидрокси-1,10-диметокси-апорфина) в его изомер О-фенантроновый алкалоид секо-болдин (**2**) в среде СКВ.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве модельного соединения использовали апорфиновый растительный алкалоид болдин (**1**) фирмы Fluka (чистота 98 %). Для проведения трансформации болдина в секо-болдин применяли СКВ.

Обработку исходного болдина проводили в стеклянных ампулах (марка «Пирекс») размером (0,4×17 см), которые заполняли 6,5 мг болдина и 1,3 мл воды и выдерживали в термостате в интервале от 100 до 230 °С в течение 30 мин. При этих условиях давление насыщенного пара внутри ампул определялось только температурой воды и составляло от 0,1 МПа при 100 °С до 2,8 МПа при 230 °С. В результате получали смесь серо-коричневого цвета, осадок отделяли центрифугированием и растворяли в смеси ацетонитрил/метанол (1 : 1, по объему). Растворы фильтровали (фильтр 0,45 мкм), водную и органическую фракции анализировали на содержание основных веществ методом ВЭЖХ. Основная часть секо-болдина (76—87 %) находилась в органической фракции. Далее органическую фракцию сушили под вакуумом на роторном испарителе и определяли количество болдина и секо-болдина в сухом продукте методом ВЭЖХ.

Анализ ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе «Agilent 1200 LC-МС» в обращенно-фазовом варианте с диодно-матричным детектированием (ДАД) в диапазоне длин волн от 190 до 1100 нм. Апорфиновый алкалоид — болдин имеет в УФ-области спектра максимум поглощения при 220 нм, а его фенантреновый продукт секо-болдин — при 264 нм. Условия хроматографического анализа: подвижная фаза:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 20:80; скорость подвижной фазы 0,15 мл/мин; температура колонки 35 °С; время удерживания 20 мин; объем вводимой пробы 1 мкл; колонка Zorbax C18 (150 мм × 21 мм; размер частиц сорбента 3,5 мкм). Количественное определение болдина и секо-болдина проводили по методу абсолютной калибровки по стандартным растворам в смеси ацетонитрил/метанол 1:1. Линейный диапазон для болдина и секо-болдина составил 0,0026—0,515 и 0,0014—0,2808 мг/мл соответственно.

Для ВЭЖХ-анализа использовали ацетонитрил фирмы Merck квалификации ВЭЖХ-МС. Идентификацию продуктов реакции выполняли методами ВЭЖХ-МС с ионизацией электроспреем (ESI-MS) для детектирования положительных ионов в интервале от 50 до 3000 Да (ВЭЖХ-МС система «HPLC Agilent-1200» и «MS-Bruker Daltonics MicrOTOF-Q»). <sup>1</sup>H-спектры ЯМР регистрировали с помощью спектрометра «Varian», 300 МГц, DMSO.

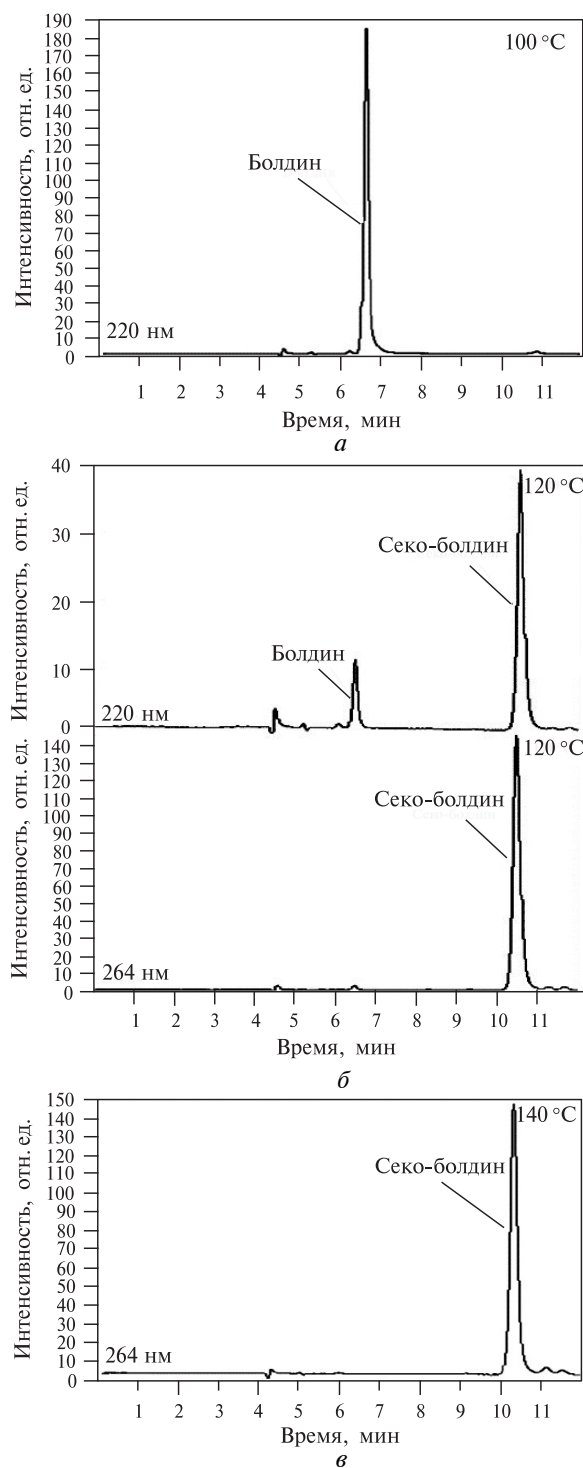
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты хроматографического анализа продуктов трансформации болдина в среде СКВ, представлены на рис. 2.

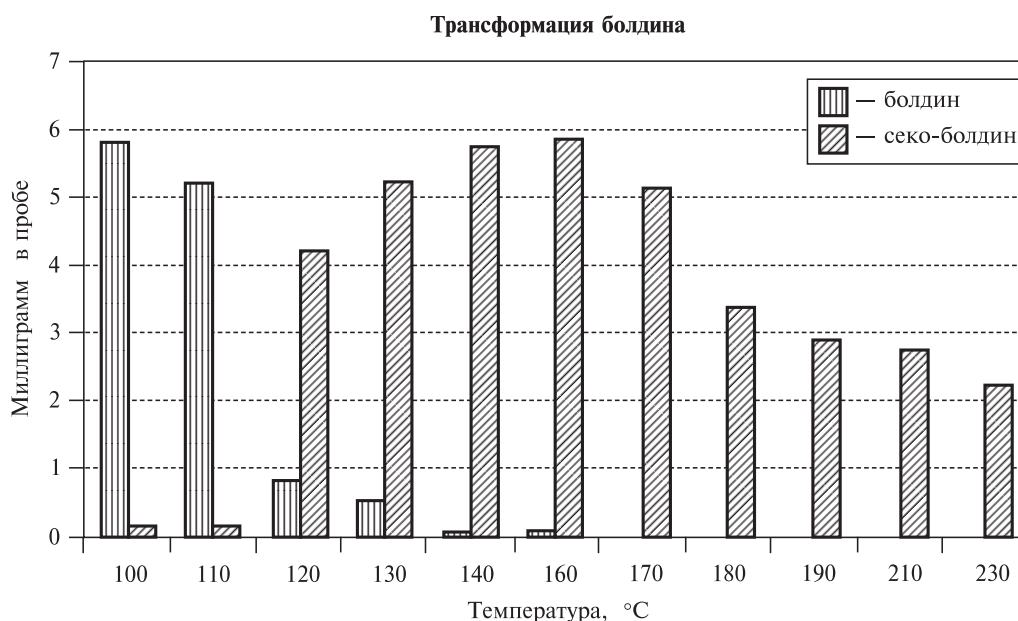
Как следует из полученных данных, по мере нагревания образца (30 мин), наряду с пиком соответствующего стандарту болдина (**1**), регистрируемого на длине волны 220 нм при  $RT_1 = 6,4$  мин, уже при 100 °С на длине волны 264 нм появляется новый минорный хроматографический пик при  $RT_2 = 10,3$  мин, который может быть отнесен к продукту превращения болдина — секо-болдину (**2**) (рис. 2а). Дальнейшее нагревание приводит к уменьшению интенсивности пика болдина (**1**) и увеличению пика продукта трансформации (**2**) при  $RT_2 = 10,3$  мин (рис. 2б). Уже при 140 °С на месте выхода пика исходного болдина остаются следы, и основным пиком на хроматограмме становится пик (**1**) (рис. 2в). Дальнейший нагрев образца свыше 160 °С ведет к уменьшению интенсивности пика секо-болдина (**2**) и появлению двух новых минорных пиков, с временами выхода большими, чем время выхода продукта (**2**).

Для установления структуры продукта трансформации болдина изучены масс-спектры продукта (**2**). Масс-спектр продукта (**2**), полученного при 160 °С, демонстрирует пики с  $m/z$ , равным 328,20, 297 и 265, что совпадает с ключевыми фрагментами стандарта болдина. При последующем ударе  $MS^2$  регистрируются осколки с  $m/z$  237, 205, 177, 222. Это показывает, что продукт, полученный в результате обработки болдина (**1**) в среде СКВ, представляет собой его изомер — секо-болдин (**2**). Массы полученных ионов совпадают с результатами, описанными в работе [20].

Данное предположение находит подтверждение в спектре ЯМР, полученном в СКВ при 160 °С продукта (**2**), при регистрации сигналов следующих групп протонов, м.д.: 2,35 (3H, s, N—CH<sub>3</sub>), 2,78 (2H, m, CH<sub>2</sub>a), 3,07 (2H, m, CH<sub>2</sub>b), 3,81 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-4), 3,95 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-6), 7,07 (1H, s, H-2), 7,19 (1H, s, H-8), 7,41 (1H, d,  $J_{9,0}$  Hz, H-9), 7,69 (1H, d,  $J_{9,0}$  Hz, H-10), 9,06 (1H, s, H-5), что характеризует полученный продукт как фенантреновый алкалоид секо-болдин (**2**). Дублиеты ароматических



**Рис. 2.** Хроматограммы продуктов обработки болдина в среде СКВ при температуре, °С:  
*a* — 100; *б* — 120; *в* — 140.  
Условия анализа: подвижная фаза  $\text{CH}_3\text{CN}/0,01\text{н } \text{H}_2\text{SO}_4$  (78:22, об.); скорость 0,3 мл/мин; температура колонки 28 °С; время анализа 20 мин; объем пробы 1 мкл; колонка ProSher C 18 St. (4 мм×150 мм; размер частиц 3 мкм)



**Рис. 3.** Зависимость выхода целевого фенантренового секо-болдина от температуры субкритической воды (30 мин)

протонов с химическими сдвигами (м.д.) 7,41 (1H, d,  $J_{9,0}$  Hz, H-9) и 7,69 (1H, d,  $J_{9,0}$  Hz, H-10) соответствуют АВ системе спинов с  $J = 9,1$  Гц ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), что полностью доказывает структуру продукта (**2**). Полученные результаты совпадают с описанными в литературе характеристиками секо-болдина (**2**) [9].

Для установления зависимости выхода целевого фенантренового секо-болдина от температуры СКВ были изучены выходы продукта обработки болдина в интервале 100–230 °C. Соответствующая гистограмма приведена на рис. 3.

Как видно из полученных результатов, болдин (**1**) практически полностью трансформируется в секо-болдин (**2**) (на 90 %) при 160 °C. При этом в сухом продукте количество секо-болдина составляет 85 %. Однако, при дальнейшем нагревании образца (при 170 °C) концентрация секо-болдина начинает убывать (см. рис. 3). При 230 °C площадь пика целевого секо-болдина составляет лишь около 30 % от площади соответствующего пика (**2**) при 160 °C (рис. 3) и приближается к следовым количествам уже при 260 °C. При этом, в ВЭЖХ-профилях продуктов, полученных при температурах выше 200 °C, наряду с уменьшением интенсивности пика (**2**) регистрируется появление новых пиков с временами выхода большими, чем время выхода пика (**2**). Последнее обстоятельство указывает на наличие процессов превращений целевого фенантренового секо-болдина в неизвестные продукты с увеличением температуры среды СКВ выше 200 °C.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые для получения фенантренового алкалоида секо-болдина из апорфинового растительного болдина предложена новая экологически чистая «one-pot»-техника с использованием среды субкритической воды. Предложенный подход получения секо-болдина позволяет избежать использования дорогостоящих токсичных

органических растворителей, не требует проведения отдельных процедур получения промежуточных продуктов реакции, а соответственно и исключает процедуры очистки этих продуктов.

Высокие выходы секо-болдина получены «one-pot»-технологией за 30 мин, что обеспечивает существенное преимущество предложенной техники по сравнению с традиционными многошаговыми процедурами.

Предлагаемый метод имеет потенциал для будущего развития недорогих и экологически чистых технологий производства новых полусинтетических субстанций в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке внутреннего гранта Южного федерального университета (проект № ВнГр-07/2017-04) и гранта РФФИ № 19-33-90211-Аспиранты (Хизриева С.С. — в части изучения ЯМР- и масс-спектров).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cassels B., Fuentes-Barros G., Castro-Saavedra S. // *Cur. Trad. Med.* 2019. Vol. 5. P. 31.
2. O'Brien P., Carrasco-Pozo C., Speisky H. // *Chem.-Biolog. Inter.* 2006. Vol. 159. No 1. P. 1.
3. Schmeda-Hirschmann G., Rodriguez J.A., Theoduloz C., Astudillo S.L., Feresin G.E., Tapia A. // *Free Rad. Res.* 2003. Vol. 37. No 4. P. 447.
4. Bannach R., Valenzuela A., Cassels B.K., Nunez-Vergara L.J., Speisky H. // *Cell Biol. Toxicol.* 1996. Vol. 12. No 2. P. 89.
5. Russo A., Cardile V., Caggia S., Gunther G., Troncoso N., Garbarino J.J. // *J. of Pharmacy and Pharmacol.* 2011. Vol. 63. No 9. P. 1219.
6. González-Cabello R., Speisky H., Bannach R., Valenzuela A., Fehér J., Gergely P.J. // *Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 1994. Vol. 4. No 3. P. 139.
7. Lanhers M.C., Joyeux M., Soulimani R., Fleurentin J., Sayag M., Mortier F., Pelt J.M. // *Planta Med.* 1991. Vol. 57. No 2. P. 110.
8. Jang Y.Y., Song J.H., Shin Y.K., Han E.S., Lee C.S. // *Pharmacol. Res.* 2000. Vol. 42. No 4. P. 361.
9. Mollataghi A., Coudiere E., Hadi A.H.A., Mukhtar M.R., Awang K., Litaudon M., Ata A. // *Fitoterapia.* 2012. Vol. 83. No 2. P. 298.
10. Milian L., Estelles R., Abarca B., Ballesteros R., Sanz M.J., Blázquez M.A. // *Chem. Pharm. Bull.* 2004. Vol. 52. No 6. P. 696.
11. Santanam N., Penumetcha M., Speisky H., Parthasarathy S. // *Atherosclerosis.* 2004. Vol. 173. No 2. P. 203.
12. Chiou C.M., Kang J.J., Lee S.S. // *J. Nat. Prod.* 1998. Vol. 61. No 1. P. 46.
13. Shamma M., Moniot M.S.J. *Isoquinoline Alkaloid Research. 1972—1977.* N.Y.: Plenum. Press, 1978.
14. Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H. // *Toxicology.* 2002. Vol. 177. No 1. P. 67.
15. Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Хизриева С.С., Бугаева А.Ф. // *Химия раст. сырья.* 2017. № 1. С. 85.
16. Ветрова Е.В., Курбатов С.В., Борисенко С.Н., Лекарь А.В., Хизриева С.С., Борисенко Н.И., Минкин В.И. // *Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика.* 2017. Т. 12. № 2. С. 19.
17. Galkin A.A., Lunin V.V. // *Russian Chem Rev.* 2005. Vol. 74. P. 21.
18. Lekar A.V., Borisenko S.N., Vetrova E.V., Maksimenko E.V., Khizrieva S.S., Borisenko N.I., Minkin V.I. // *Nat. Prod. Commun.* 2018. Vol. 13. No 7. P. 823.
19. Максименко Е.В., Лекарь А.В., Борисенко С.Н., Хизриева С.С., Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. // *Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика.* 2018. Т. 13. № 2. С. 15.
20. Stévigny C., Jivan J. L. H., Rozenberg R., de Hoffmann E., Quetin-Leclercq J. // *Rapid Commun. in Mass Spectr.* 2004. Vol. 18. No 5. P. 523.

**«ONE-POT» TECHNIQUE FOR TRANSFORMATION  
OF THE APORPHINE ALKALOID BOLDINE TO PHENANTHRENE  
SECO-BOLDINE BY SUBCRITICAL WATER**

**A. V. Lekar, E. V. Maksimenko, S. N. Borisenko, S. S. Khizrieva,  
N. I. Borisenko, V. I. Minkin**

*Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia*

A «one-pot» method was developed and studied for the production of phenanthrene seco-boldine from the aporphine plant alkaloid boldine in a medium of subcritical water. The effectiveness of the proposed method for producing seco-boldine in a medium of subcritical water was studied in the temperature range from 100 to 230 °C. It has been established that the “one-pot” technique in the environment of subcritical water makes it possible to achieve a quantitative yield of seco-boldine in one step, without using any catalytic additives. The structure of the obtained product was confirmed by NMR-spectrometry and ESI MS-spectrometry. The proposed technique does not require the use of expensive and toxic organic solvents. The time-consuming of the proposed approach to producing seco-boldine is 30 minutes, which allows us to move on to the development of environmentally friendly low cost technologies for the production of seco-boldine in medium of subcritical water.

**Key words:** «one-pot», aporphine alkaloids, boldine, seco-boldine, subcritical water, phenanthrene alkaloids, HPLC, NMR.

---

---