

Р. Г. Савченко (к.х.н., доц.), В. Н. Одинок (д.х.н., проф.)

**ВЗАМОДЕЙСТВИЕ ДИАЦЕТОНИДА
20-ГИДРОКСИЭКДИЗОНА С LiAlD₄**Институт нефтехимии и катализа РАН, лаборатория органического синтеза
450075 г. Уфа, пр. Октября, 141; e-mail: rimasavchenko@mail.ru

R. G. Savchenko, V. N. Odinokov

**INTERACTION OF 20-HYDROXYECDYSONE DIACETONIDE
WITH LiAlD₄**Institute of Petrochemistry and Catalysis RAS
141, Prospekt Oktyabrya Str., 450075, Ufa, Russia, e-mail: rimasavchenko@mail.ru

Опубликованные в 2023 г. данные рандомизированных клинических «доза–эффект» исследований для экдистероида 20-гидроксиэкдизона показали, что природная молекула метаболизируется с участием боковой цепи и 14-гидрокси-7-ен-6-кетонного (хромофорного) фрагмента молекулы, образуя *in vivo* короткоцепочные производные и продукты 1.2-, 1.4-восстановления кольца В. В этой связи в представленной работе нами изучено взаимодействие диацетонида 20Е с литий алюминий дейтеридом (LiAlD₄) и впервые получены ²H-меченные производные – потенциальные биологически-активные стероидные метаболиты. Установлено, что восстановление двойной связи кольца В происходит стереоселективно с образованием устойчивого 7,8α-дейтероаналога 20Е, тогда, как восстановление оксо-фрагмента приводит к эпимерной смеси 6α/β[²H] неустойчивого аллильного спирта. Последний в растворе CDCl₃ трансформируется в (20R, 22R)-2β,3β:20,22-бис(изопропилидендиокси)-5β,8α-холест-14-ен-6β[²H], 25-диол.

Ключевые слова: гидридный реагент; 20-гидроксиэкдизон; изотоп водорода; синтез; экдистероид.

Работа выполнена в рамках государственного задания FMRS-2022-0081. Структурные исследования проведены в региональном Центре коллективного пользования «Агидель» УФИЦ РАН.

Экдистероиды представляют собой обширную группу полигидроксилированных стероидов, присутствующих в различных объектах живой природы и близких по структуре их первому представителю α-экдизону ¹. 20-Гидроксиэкдизон (20Е) – наиболее доступный и представительный экдистероид, выделяемый нами из растения *Serratula coronata* ². Тетрациклический стероид-

Дата поступления 08.07.24

Data published in 2023 from randomized clinical dose-effect studies for the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone showed that the natural molecule is metabolized involving the side chain and the 14-hydroxy-7-ene-6-ketone (chromophore) fragment of the molecule, forming *in vivo* short-chain derivatives and products of 1.2-, 1.4-reduction of ring B. In this regard, in the presented work we have studied the interaction of diacetone 20E with lithium aluminum deuteride (LiAlD₄) and obtained for the first time ²H-labeled derivatives, potential bioactive steroid metabolites. It was found that the reduction of the double bond of ring B occurs stereoselectively to form the stable 7,8α-deutero analog 20E, whereas the reduction of the oxo-fragment leads to an epimeric mixture of 6α/β[²H] unstable allylic alcohol. The latter is transformed in CDCl₃ solution to (20R, 22R)-2β,3β:20,22-bis(isopropylidenedioxy)-5β,8α-cholest-14-ene-6β[²H], 25-diol.

Key words: ecdysteroid; hydride reagent; hydrogen isotope; 20-hydroxyecdysone; synthesis.

The work was carried out within the framework of the state assignment FMRS-2022-0081. Structural studies were carried out at the regional Center for Collective Use «Agidel» of the Ufa Federal Research Center of the RAS.

ный остов его молекулы имеет: *цис*-сочленение колец А/В (5β-Н), Δ⁷-6-оновый хромофорный фрагмент, *транс*-сочленение С/Д колец (α-14-ОН или Н) и боковую цепь. Особая роль в направленных модификациях стероидного остова 20Е отведена 14-гидрокси-7-ен-6-оновому фрагменту молекулы, который может быть вовлечен в различные восстановительные трансформации с целью получения структурных аналогов brassinos-

тероидов и морских стероидов³. В 2023 г. были опубликованы данные зависимости «доза–эффект» влияния 20-гидроксиэкдизона на организм человека, согласно которым было выявлено, что природная молекула метаболизируется с участием боковой цепи и 14-гидрокси-7-ен-6-кетонного (хромофорного) фрагмента молекулы, образуя *in vivo* продукты 1,2-, 1,4-восстановления кольца В⁴.

В последнее время расширяется спектр перспектив практического применения дейтерийсодержащих соединений, благодаря относительной стабильности связи углерод–дейтерий⁵. Введение изотопного атома водорода (²H) в биологически активную молекулу позволяет более детально изучить ее химическое и биологическое поведение⁶. В связи с этим мы провели взаимодействие 2,3:20,22-диацетонда 20Е с LiAlD₄.

Проведенное ранее исследование восстановительных трансформаций экидистероидов холестерина типа с помощью комплексных гидридов щелочных металлов показало преимущественное образование продуктов 1,2- и 1,4-восстановления α,β-ненасыщенного оксо-фрагмента стероидного остова и их 14-дезоксипроизводных⁷, а для стероидов прегнанового ряда наряду с восстановлением кольца В был выделен 13(14→8)-абео стероид как результат произошедшей молекулярной перегруппировки с участием аллильной 14-ОН группы⁸. Следовательно, есть определенное внутримолекулярное влияние этой группы на структуру образующихся продуктов реакции. Интересно, что при изучении метаболизма 20Е на организме человека было установлено, что в плазме крови всех испытуемых присутствовало 14-дезоксипроизводное 20Е, т.е. именно оно является метаболитически стабильным⁴.

Для более детального исследования восстановительного процесса 7-ен-6-кетонного фрагмента экидистероидной молекулы был задействован LiAlD₄. Так, в реакции 2,3:20,22-диацетонда 20Е **2**, полученного ацетонированием экидестероида **1** в кислых условиях⁹, с 1,5 ммол-экв литий алюминий дейтерида и последующим кислым гидролизом наблюдалось образование смеси моно-дейтерированных продуктов **3**, **4**, **5** (схема). Структура и стереохимические особенности синтезированных продуктов были установлены после хроматографического разделения на основании гомо- и гетерокорреляционных методик 1D, 2D ЯМР ¹H и ¹³C и сравнений их спектральных характеристик с данными для противеых аналогов¹⁰. Так, для продукта 1,4-восстановления 7-ен-6-онового фрагмента стероидной молекулы **3** (38%) (ЯМР ¹³C) отсутствие сигналов sp²-атомов и сильно-польный сдвиг сигнала атома C⁸ (δ_C 43.23 м. д., J_{C-D}=21.5 Гц) свидетельствовали о восстановле-

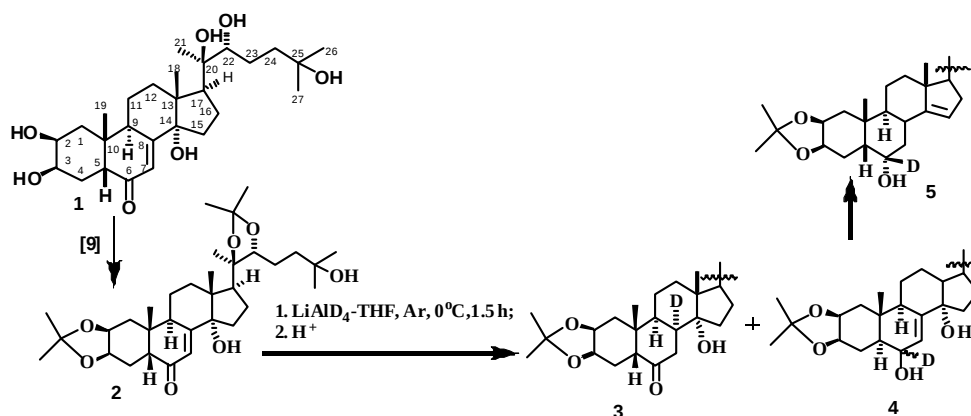
нии двойной связи кольца В и локации ²H-атома. Сравнение остальных значений спектральных данных с отнесениями для противеого аналога¹⁰ подтверждало 8α-конфигурацию изотопного атома.

Ранее было установлено, что в ряду экидестероидов продукты 1,2-восстановления ненасыщенного кето-фрагмента стероидного остова претерпевают инверсию конфигурации при атоме C⁵H. Соответственно, сочленение А/В-колец меняется с *цис*-(5β) на *транс*-(5α), что опосредует высокую лабильность 14α-ОН группы к элиминированию¹¹. Вследствие этого факта, структура аллильного спирта **4** оказалась неустойчивой, регистрация его спектров (CDCl₃, ЯМР ¹H, ¹³C) показала наличие удвоения сигналов при атомах C⁷, C⁸, C¹⁴, присутствие дополнительных к имеющимся (C⁷ и C⁸) сигналов sp²-атомов, отнесенных атомам C¹⁴ и C¹⁵, а также два триплетных сигнала атома C⁶ (δ_C 71.47–72.62 м. д., J_{C-D}=19 Гц), несущего вторичную гидроксильную группу (схема). При нахождении в ампуле (CDCl₃) в течение 7 дней соединение **4** перешло в соединение **5** (схема). Одиночный набор всех сигналов атомов С и Н в спектрах ЯМР ¹H и ¹³C для его структуры подтверждал ее конфигурационную однородность. Наличие триплетного сигнала атома углерода в области сигналов вторичных гидроксильных групп (δ_C 71.90, J_{C-D}=22 Гц, сравнивая с ¹⁰) свидетельствовало об β-²H-конфигурации при атоме C⁶. На основании гомо- и гетерокорреляционных ЯМР ¹H и ¹³C экспериментов, а также сравнения полученных данных с характеристиками для ранее синтезированного (20R, 22R)-2β,3β:20,22-бис(изопропилидендиокси)-5β,8α-холест-14-ен-6β,25-диола¹⁰ было установлено, что соединение **5** является его [6β-²H]-изотопным аналогом. Степень дейтерирования синтезированных соединений **3** и **5** составила >99%, согласно данным ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения.

Таким образом, на основании проведенного исследования установлено, что восстановление 7-ен-6-кетонного фрагмента при взаимодействии ацетонида 20-гидроксиэкдизона с литий алюминий дейтеридом происходит с образованием устойчивого продукта 1,4-восстановления – 7.8α(²H)-дейтерированного аналога 5β-ряда и его 14-дезоксид-аналога; однако последний является результатом внутримолекулярной перегруппировки продукта 6-аллильного спирта.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C регистрировали на спектрометрах «Bruker Avance-500», рабочие частоты – 500.17 МГц (¹H) и 125.77 (¹³C) МГц, растворитель – CDCl₃, внутренний стандарт –



Схема

Me₄Si. Для гомо- (¹H и ¹³C) и гетероядерных экспериментов (COSY NH, NOESY, HSQC, HMBC) использовали стандартные импульсные последовательности фирмы «Bruker». Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) выполнены на приборе «Bruker MaXis impact qTOF/TOF» при ионизации методом электрораспыления (ESI). Измерения проводили в режиме детектирования положительных ионов (напряжение на капилляре 4.5 кВ); диапазон сканирования масс 50–1000 Да. Внешнюю калибровку проводили с использованием растворов «Electrospray Calibrant Solution» («Fluka»). Растворы в MeCN (50%)–H₂O (49.9%)–FA (0.1%) вводили шприцом со скоростью 3 мкл/мин. В качестве осушающего газа и газораспылителя использовали азот (скорость потока 6 л/мин), температура интерфейса – 200 °С. Температуры плавления определяли на малогабаритном нагревательном столе типа «Voetius». Удельное вращение определяли на поляриметре Perkin Elmer-141. В колоночной хроматографии применяли силикагель марки «КСКГ», 100/200. Для контроля методом ТСХ использовали пластины с SiO₂ («Silufol»), проявитель – раствор ванилина в этиловом спирте, подкисленный серной кислотой.

20-Гидроксиэкдизон (**1**) был выделен из сока растения *Serratula coronata*², 2,3;2022-диацетонд 20Е (**2**) был получен согласно⁹.

LiAl²H₄ (LiAlD₄), 98% – коммерческий реагент фирмы Thermo Scientific Chemicals.

Общая методика проведения реакции.

0.1 г (0.18 ммоль) экдистероидного субстрата **2** растворили при перемешивании в 5 мл сухого тетрагидрофурана, охладили до 0 °С и прибавили (Ar) 0.27 ммоль LiAlD₄. Реакционный раствор перемешивали 1 ч (0 °С), затем 1 ч при комнатной температуре (контроль ТСХ), нейтрализовали подкисленной водой, экстрагировали этилацетатом (3×10 мл), упарили. Сухой остаток хроматографировали на SiO₂ (3 г), используя элюент (хлороформ–метанол, 50:1). После колоночной хроматографии были выделены соединения **3** и **4**→**5**.

(**20R, 22R**)-**2β,3β:20,22**-бис(изопропилидендиокси)-**5β,8α**[²H]-холестан-6-он (**3**), (38%). *T*_{пл.} 280–282 °С. [α]_D²⁰ + 16° (с 0.24, CHCl₃). *R*_f=0.58 (CHCl₃–MeOH, 10:1).

¹H ЯМР (CDCl₃), **δ**: 1.13 (с, 3H, 18-Me), 1.15 (с, 3H, 21-Me), 1.32 (с, 3H, 19-Me), 1.25 (с, 3H, 26-Me), 1.25 (с, 3H, 27-Me), 1.25 и 1.33 (оба с, 6H, 2,3-CMe₂), 1.43 и 1.52 (оба с, 6H, 20,22-CMe₂), 1.49 и 1.71 (м, 2H, 1-H), 1.98 (м, 1H, 9-H), 1.99 (м, 2H, 4-H), 1.72–2.00 (м, 12H, CH₂ (11, 12, 15, 16, 23, 24)), 2.21 (м, 1H, 17-H), 2.31 (д, 1H, *J* = 11 Гц, **7β**-H), 2.60 (дд, *J* = 2.0 Гц, *J* = 7.0 Гц, 1H, 5-H), 2.78 (д, 1H, *J* = 11 Гц, **7α**-H), 3.67 (д, 1H, *J* = 8 Гц, 22-H), 4.23 (м, 1H, 2-H), 4.58 (м, 1H, 3-H); ¹³C ЯМР (CDCl₃), **δ**: 17.87 (C11), 18.16 (C18), 21.16 (C16), 21.40 (C21), 23.61 (C23), 25.93 (C19), 25.44 и 26.77 (20,22-Me₂C), 25.44 (C4), 25.52 (C15), 28.53 и 28.98 (2,3-Me₂C), 29.10 (C26), 29.73 (C27), 31.46 (C12), 34.31 (C1), 39.61 (C10), 41.34 (C7), 41.59 (C24), 43.00 (C8, *J* = 21.5 Гц), 46.92 (C13), 49.89 (C5), 50.61 (C17), 70.24 (C25), 70.91 (C3), 73.56 (C2), 81.96 (C22), 84.50 (C20), 85.10 (C14), 106.95 (20,22-Me₂C), 107.72 (2,3-Me₂C), 212.05 (C6). HRMS, *m/z*: найдено 586.3839 [M+Na]⁺, вычислено C₃₃H₅₃DO₇Na 586.39.

(**20R, 22R**)-**6α/β**[²H], **14α, 25**-тригидрокси-**2β,3β:20,22**-бис(изопропилидендиокси)-**5α**-холест-**7-ен** (**4**), (38%). *T*_{пл.} 124–128 °С. *R*_f=0.53 (CHCl₃–MeOH, 10:1).

¹H ЯМР (CDCl₃), **δ**: 0.75 (с, 3H, 18-Me), 0.88 и 1.03 (с, 3H, 19-Me), 1.12 (с, 3H, 21-Me), 1.22 (с, 6H, 25,26-Me), 1.25 и 1.33 (оба с, 6H, 2,3-CMe₂), 1.43 и 1.52 (оба с, 6H, 20,22-CMe₂), 1.65–2.14 (м, 18H, CH, CH₂), 2.27–2.36 (м, 1H, 9-H), 3.67 (м, 1H, 22-H), 4.09–4.12 (м, 1H, 2-H), 4.22–4.25 (м, 1H, 3-H), 5.46–5.62 (м, 1H, 7-H). HRMS, *m/z*: найдено 586.3839 [M+Na]⁺, вычислено C₃₃H₅₃DO₇Na 586.39.

(**20R, 22R**)-**2β,3β:20,22**-бис(изопропилидендиокси)-**5β,8α**-холест-**14-ен-6β**[²H], **25**-диол (**5**). *T*_{пл.} 106–108 °С. [α]_D²⁰ + 25° (с 0.28, CHCl₃). *R*_f = 0.63 (CHCl₃–MeOH, 10:1).

^1H ЯМР (CDCl_3), δ 1.16 (с, 3H, 18-Me), 1.19 (с, 3H, 21-Me), 1.21 (с, 3H, 19-Me), 1.25 (с, 3H, 26-Me), 1.25 (с, 3H, 27-Me), 1.31 и 1.44 (оба с, 6H, 2,3- CMe_2), 1.33 и 1.54 (оба с, 6H, 20,22- CMe_2), 1.57 и 2.40 (м, 2H, 1-H), 1.50 (м, 1H, 5-H), 1.85 (м, 1H, 9-H), 1.85 (м, 1H, 17-H), 1.88 (м, 2H, 4-H), 1.90 (м, 1H, 8-H), 1.72-2.00 (м, 10H, CH_2 (11, 16, 12, 23, 24)), 2.08 (м, 2H, 7-H), 3.79 (д, 1H, $J = 8$ Гц, 22-H), 4.38 (м, 1H, 2-H), 4.65 (м, 1H, 3-H), 5.37 (т, 1H, $J = 11$ Гц, 15-H); ^{13}C ЯМР (CDCl_3), δ 17.43 (C11),

20.80 (C18), 21.00 (C21), 29.70 (C23), 30.52 (C16), 27.32 (C19), 25.88 и 26.47 (20,22- Me_2C), 25.52 (C15), 28.63 и 28.93 (2,3- Me_2C), 29.78 (C26), 29.78 (C27), 30.94 (C9), 31.54 (C4), 33.38 (C10), 35.97 (C1), 40.82 (C5), 41.59 (C24), 43.13 (C12), 46.84 (C13), 48.12 (C8), 59.50 (C17), 70.34 (C25), 71.90 (C6, $J = 22$ Гц), 72.77 (C3), 74.62 (C2), 81.79 (C22), 83.70 (C20), 106.89 (20,22- Me_2C), 107.06 (2,3- Me_2C), 120.61 (C15), 154.34 (C14). HRMS, m/z : найдено 571.3913 $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$, вычислено $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{DO}_6\text{Na}$ 571.39.

Литература

1. Butenadt A., Karlson P. Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristallisierter Form // *Zeitschrift für Naturforschung B*. – 1954. – V.9, №6. – Pp.389-391.
2. Odinokov V.N., Galyautdinov I.V., Nedopekin D.V., Khalilov L.M., Shashkov A.S., Kachala V.V., Dinan L., Lafont R. Phytoecdysteroids from the juice of *Serratula coronata* L. (Asteraceae) // *Insect Biochem. Mol. Biol.* – 2002. – V.32, №2. – Pp.161-165.
3. Savchenko R.G., Odinokov V. N. Hydrogenation of ecdysteroids // *Steroids*. – 2012. – V.77, №14. – Pp.1523-1529.
4. Dioh W., Tourette C., Del Signore S., Daudigny L., Dupont P., Balducci C., Dilda P. J., Lafont R., Veillet S. A Phase 1 study for safety and pharmacokinetics of BIO101 (20-hydroxyecdysone) in healthy young and older adults // *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. – 2023. – V.14, №3. – Pp.1259-1273.
5. Wiberg K. B. The Deuterium Isotope Effect // *Chem. Rev.* – 1955. – V.55, №4. – Pp.713-743.
6. Korf S., Bourriquen F., Li W., Nuemann H., Jange K., Beller M. Recent Developments for the Deuterium and Tritium Labeling of Organic Molecules // *Chem. Rev.* – 2022. – V.122, №6. – Pp.6634-6718.
7. Одиноков В.Н., Савченко Р.Г., Шафиков Р.В., Афонькина С.Р., Халилов Л.М., Качала В. В., Шашков А.С. Стереохимия гидридного восстановления производных 20-гидроксизекдизона // *ЖОрХ*. – 2005. – Т.41, №9. – С.1323-1330.
8. Savchenko R.G., Kostyleva S.A., Apaeva A.V., Mozgovoj O. S., Sauchuk A. L., Zhabinskii V.N., Mesheryakova E. S., Parfenova L. V., Odinokov V. N. Molecular rearrangements of poststerone derivative steroid core with formation of unique D-homostructures of pregnane and androstane series // *Steroids*. – 2019. – V.148. – Pp.28-35.
9. Suksamrarn A., Pattanaprateep P. Selective acetylation of 20-hydroxyecdysone partial synthesis of some minor ecdysteroids and analogues // *Tetrahedron*. – 1995. – V.51. – Pp.10633-10650.
10. Одиноков В.Н., Афонькина С.Р., Шафиков Р.В., Савченко Р.Г., Галютдинов И.В., Халилов Л.М., Шашков А.С. 7,8-Дигидроаналоги экдистероидов // *ЖОрХ*. – 2007. – Т.43, №6. – С.830-837.
11. Haag T., Luu B., Hetru C. Synthesis of putative precursors of ecdysone. Part 3. Synthesis of 3β , 14α , 25-trihydroxy- 5β -cholest-7-en-6-one // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1*. – 1988. – Pp.2353-2363.

References

1. Butenadt A., Karlson P. [Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristallisierter Form]. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 1954, vol.9, no.6, pp.389-391.
2. Odinokov V.N., Galyautdinov I.V., Nedopekin D.V., Khalilov L.M., Shashkov A.S., Kachala V.V., Dinan L., Lafont R. [Phytoecdysteroids from the juice of *Serratula coronata* L. (Asteraceae)]. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2002, vol.32, no.2, pp.161-165.
3. Savchenko R.G., Odinokov V. N. [Hydrogenation of ecdysteroids]. *Steroids*, 2012, vol.77, no.14, pp.1523-1529.
4. Dioh W., Tourette C., Del Signore S., Daudigny L., Dupont P., Balducci C., Dilda P. J., Lafont R., Veillet S. [A Phase 1 study for safety and pharmacokinetics of BIO101 (20-hydroxyecdysone) in healthy young and older adults]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2023, vol.14, no.3, pp.1259-1273.
5. Wiberg K. B. [The Deuterium Isotope Effect]. *Chem. Rev.*, 1955, vol.55, no.4, pp.713-743.
6. Korf S., Bourriquen F., Li W., Nuemann H., Jange K., Beller M. [Recent Developments for the Deuterium and Tritium Labeling of Organic Molecules]. *Chem. Rev.*, 2022, vol.122, no.6, pp.6634-6718.
7. Odinokov V.N., Savchenko R.G., Shafikov R.V., Afon'kina S.R., Khalilov L.M., Kachala V.V., Shashkov A.S. [Stereochemistry of hydride reduction of 20-hydroxyecdysone derivatives]. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2005, vol.41, no.9, pp.1296-1305.
8. Savchenko R.G., Kostyleva S.A., Apaeva A.V., Mozgovoj O.S., Sauchuk A.L., Zhabinskii V.N., Mesheryakova E.S., Parfenova L.V., Odinokov V. N. [Molecular rearrangements of poststerone derivative steroid core with formation of unique D-homostructures of pregnane and androstane series]. *Steroids*, 2019, vol.148, pp.28-35.
9. Suksamrarn A., Pattanaprateep P. [Selective acetylation of 20-hydroxyecdysone partial synthesis of some minor ecdysteroids and analogues]. *Tetrahedron*, 1995, vol.51, pp.10633-10650.
10. Odinokov V.N., Afon'kina S.R., Shafikov R.V., Savchenko R.G., Galyautdinov I.V., Khalilov L.M., Shashkov A.S. [7,8-Dihydro analogs of ecdysteroids]. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2007, vol.43, no.6, pp.825-833.
11. Haag T., Luu B., Hetru C. [Synthesis of putative precursors of ecdysone. Part 3. Synthesis of 3β , 14α , 25-trihydroxy- 5β -cholest-7-en-6-one]. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1*, 1988, pp.2353-2363.