

На правах рукописи

**Веськина Наталья Анатольевна**

**МАЛОПОЛЯРНЫЕ ФИТОЭКДИСТЕРОИДЫ *SERRATULA*  
*CORONATA* L. И НОВЫЕ ТРАНСФОРМАЦИИ 20-  
ГИДРОКСИЭКДИЗОНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ**

**02.00.03 - Органическая химия**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук**

**Уфа - 2004**

Работа выполнена в Институте нефтехимии и катализа Академии наук Республики Башкортостан и Уфимского научного центра Российской Академии наук.

Научные руководители: доктор химических наук,  
профессор Одинокое В.Н.

Официальные оппоненты: доктор химических наук,  
профессор Балтина Л.А.  
кандидат химических наук,  
доцент Кондратенко Р.М.

Ведущая организация: Башкирский государственный  
университет

Защита диссертации состоится 23 декабря 2004 года в 14<sup>22</sup> на заседании диссертационного совета Д 002.062.01 в Институте нефтехимии и катализа АН РБ и УНЦ РАН по адресу: 450075, Уфа, проспект Октября, 141.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института нефтехимии и катализа АН РБ и УНЦ РАН.

Автореферат разослан «        » ноября 2004 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор химических наук, профессор

 Булгаков Р.Г.

## Общая характеристика работы

'Актуальность темы. Экдистероиды представляют собой обширную группу полигидроксилированных стероидов, выполняющих роль гормонов линьки, метаморфоза и диапаузы насекомых и ракообразных. Впервые обнаруженные у насекомых, экдистероиды затем были выявлены во многих видах растений в значительно более высоких концентрациях (2-2.5% против  $10^{-6}$  % от общей массы объектов).

Исследования выделенных из растительных источников фитоэкдистероидов показали, что эти нетоксичные для млекопитающих вещества обладают комплексом ценных для медицины свойств и, следовательно, перспективны для создания на их основе высокоактивных препаратов. Определенный интерес фитоэкдистероиды представляют для пчеловодства и шелководства, а также в качестве средств защиты растений от фитофагов, неадаптированных к определенным типам экдистероидов.

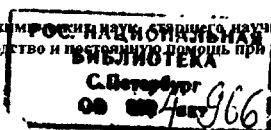
Одним из наиболее богатых экдистероидами (суммарное содержание ~2.2% от воздушно-сухого сырья) источников является растение *Serratula coronata* L., произрастающее на территории Южного Урала. Хотя об исследовании экдистероидного состава *S. c.* сообщалось ранее, оставались неизученными малополярные компоненты экстрактов из этого растения.

Недостаточно исследованы возможности синтетических трансформаций главного компонента экдистероидной композиции *Serratula coronata* L. - 20-гидроксиэкдизона и его производных в новые или малодоступные экдистероиды либо их аналоги, представляющие интерес в качестве биологически активных соединений с новым комплексом свойств.

В этой связи исследования по выделению и идентификации фитоэкдистероидов из природных источников, а также изучение трансформаций природных фитоэкдистероидов представляются весьма актуальными.

---

\* Автор благодарит кандидата химических наук, старшего научного сотрудника Галаютдинова И.В. за научно-методическое руководство и постоянную помощь при выполнении работы.



Работа выполнялась как плановая в Институте нефтехимии и катализа АН РБ и УИЩ РАН по теме: «Химия экистероидов и хроманолов: синтез и трансформации» (номер государственной регистрации 01.200.204384), частично финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 04-03-33103).

**Цель работы** состояла в исследовании малополярных фракций экстракта из сока растений *Serratula coronata* L., в изучении трансформаций 20-гидроксиэкдизона и синтезе новых и редко встречающихся в природных продуцентах экистероидов.

**Научная новизна.** Из неисследованных ранее малополярных фракций сока *Serratula coronata* L. путем комбинации колоночной хроматографии и ВЭЖХ выделено и идентифицировано (с применением ID и 2D экспериментов ЯМР \*Н и <sup>13</sup>С и масс-спектров с химической ионизацией) 11 фитоэкистероидов, из них - 4 новых: 22-О-ацетилэкдизон, 26-0-ацетил-255'-инокостерон, 20,22-0-(1Я-этилиден)-20-гидроксиэкдизон и 20,22-0-(1R-этилиден)аюгастерон С, а 2- и 3- ацетаты 20-гидроксиэкдизона, 22-ацетат полиподина В и 20,22-ацетонид аюгастерона С впервые выделены из данного вида растений.

Взаимодействием 20-гидроксиэкдизона с ацетальдегидом, бутан-2-оном, пентан-2,4-дионом и фурфуролом синтезированы новые 20,22-моно- и 2,3:20,22-диацетали. Показано, что из полученных диацеталей наиболее приемлемым для синтеза витикостерона Е является 2,3:20,22-бис-0-(этилден)-20-гидроксиэкдизон, последующие 3-х стадийные трансформации которого привели к целевому фитоэкистероиду с суммарным выходом 84%, а его селективным гидролизом получен 20,22-0-(этилиден)-20-гидроксиэкдизон, идентичный выделенному из 5. с. новому фитоэкистероиду.

Изучена стереохимия оксимирования 20-гидроксиэкдизона и его ди-ацетонида, найдены условия синтеза соответствующих 6-оксимов (*E*)-конфшурации и (6Z)-ОКСНМОВ отвечающих им 14Д5-ангадропроизводных.

Впервые исследованы трансформации экдистероидов, протекающие в жидком аммиаке под действием щелочных металлов. На примере 20-гидроксиэкдизона и его ацетонидов обнаружено, что вместо характерного для  $\alpha,\rho$ -енонов восстановления двойной связи с образованием соответствующих насыщенных кетонов в случае экдистероидов происходит НС(9)-НОС(14)-дегидрирование, приводящее к образованию кислородного мостика между атомами С(9) и С(14) с формированием 9 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -оксетанового цикла. При этом имеет место С(5)-эпимеризация. Наряду с оксетанами выделены также неизвестные ранее 14{3-эпимеры исходных экдистероидов. Установлено, что в водном метаноле 9 $\alpha$ , 14 $\alpha$ -оксетаны претерпевают прототропную изомеризацию с образованием неописанных ранее 9 $\alpha$ -гидрокси-5 $\alpha$ -стахистерона В и его 20,22-ацетонида, а в случае 9 $\alpha$ , 14 $\alpha$ -оксетана из 20-гидроксиэкдизона в реакционной среде обнаружен и выделен продукт более глубокой структурной перестройки, вызванной миграцией кислорода мостика от С(14) к С(13) атому с 1,2-сдвигом метильной группы от С(13) в С(14) положение с сохранением Р-конфигурации.

Практическая значимость. Из ранее неисследованных малополярных фракций *Serratula coronata* L. выделены 11 фитоэкдистероидов, определена их экдизонная активность (биотест на *Drosophila melanogaster* выполнен на кафедре биологии Экстерского университета (Великобритания) профессором Л. Дайненом):

Фитоэкдистероид	Экдизонная (линочная) активность (ED <sub>50</sub> , моль/мл)
Макистерон С (1)	1.7 x 10 <sup>-7</sup>
20,22- <i>O</i> -(Изопропилиден)-20-гидроксиэкдизон (2)	1.1 x 10 <sup>-6</sup>
20,22- <i>O</i> -(Изопропилиден) аюгастерон С (3)	6.0 x 10 <sup>-7</sup>
2- <i>O</i> -Ацетил-20-гидроксиэкдизон (4)	1.2 x 10 <sup>-7</sup>
Витикостерон Е (6)	4.2 x 10 <sup>-8</sup>
22- <i>O</i> -Ацетилэкдизон (7)	1.1 x 10 <sup>-6</sup>
22- <i>O</i> -Ацетилполипидин В (8)	9.0 x 10 <sup>-8</sup>

26- <i>O</i> -Ацетил-25 <i>S</i> -инокостерон (9)	$6.0 \times 10^{-8}$
20,22- <i>O</i> -(1 <i>R</i> -Этилиден)-20-гидроксиэкдизон (10)	$4.3 \times 10^{-7}$
20,22- <i>O</i> -(1 <i>R</i> -Этилиден)аюгастерон С (11)	$6.2 \times 10^{-7}$
20-Гидроксиэкдизон (13)	$7.5 \times 10^{-9}$

Из сока свежесобранной на стадии бутонизации надземной части *S.* выделена смесь 20-гидроксиэкдизона и экдизона в соотношении 9:1, и разработан метод выделения из этой смеси редкого экдистероида - экдизона. Метод базируется на ацетонировании с последующим разделением смеси и получением индивидуальных 2,3:20,22-диацетонида 20-гидроксиэкдизона и 2,3-ацетонида экдизона с помощью колоночной хроматографии. Гидролизом последнего получен индивидуальный экдизон.

Разработаны методы синтеза редко встречающихся в природных продуктах фитоэкдистероидов. Синтезированы потенциально обладающие противоопухолевой активностью оксимы, новые производные 20-гидроксиэкдизона и его аналоги со структурой нового типа - ранее неизвестные 14β-эпимеры, 9α-гидрокси-14Д5-ангидро-, 9сс,14α- и 9α,13α-оксапроизводные 5α-эпимерного ряда. Выявлены соединения с выраженной противовоспалительной активностью.

Апробация работы. Основные результаты исследований представлены на XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Казань, 2003), Молодёжной научной школе-конференции «Актуальные проблемы органической химии» (Новосибирск, 2003), Второй международной конференции «Химия и биологическая активность кислород- и серусодержащих гетероциклов» (Москва, 2003), Международной научной конференции «Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений» (Алматы, 2003), V Всероссийском научном семинаре и Молодёжной научной школе «Химия и медицина» (Уфа, 2003), II конкурсе научных работ молодых ученых и аспирантов УНЦ РАН и АН РБ (Уфа, 2004), Международной научно-технической конференции "Перспективы развития и практического применения алициклических соединений" (Самара, 2004).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 2 статьи и тезисы 9 докладов на конференциях, получено положительное решение по заявке на патент.

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 114 страницах компьютерного набора (формат А4) и включает введение, литературный обзор на тему «Восстановительные трансформации еноновой группировки стероидов», обсуждение результатов, экспериментальную часть, выводы, список литературы (128 наименований).

### **Основное содержание работы.**

#### **1. Выделение и идентификация малополярных фитоэкдистероидов из сока *Serratula coronata* L.**

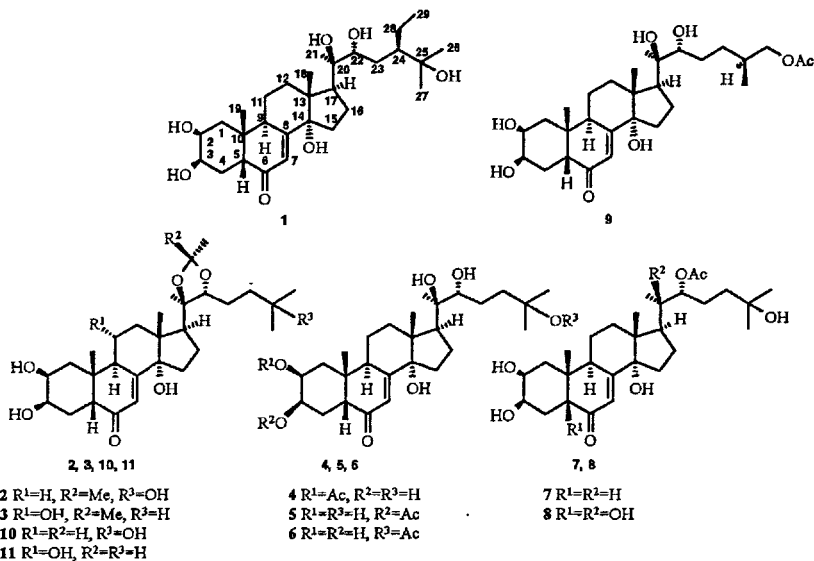
Произрастающее на территории Южного Урала многолетнее растение *Serratida coronata* L (серпуха венценосная) является одним из наиболее богатых источников фитоэкдистероидов (суммарное содержание экдистероидов достигает 2.2% в расчете на воздушно-сухую массу надземной части) Наряду с главным компонентом экдистероидного букета *S.c.* — 20-гидроксиэкдизоном (~2.0%), ранее было выделено и идентифицировано 13 минорных фитоэкдистероидов

Однако ранее не были исследованы экстракты малополярных фракций сока *S.c.* Комбинацией колоночной хроматографии (SiO<sub>2</sub>, элюент СНСl<sub>3</sub>-MeOH, 25.1) и ВЭЖХ\* были выделены, и с помощью Ш и 2D экспериментов ЯМР\* (COSY, TOCSY, PFG-HSQC и PFG-HMBC), масс-спектрометрии с химической ионизацией\* (ХИ-МС) идентифицированы

\* ВЭЖХ выполнялась проф R. Lafont в лаборатории молекулярной эндокринологии Университета Пьера и Марии Кюри (Париж) на приборе Waters с двумя насосами высокого давления (6000 ат), программа M720, автоматический инжектор WEP, детектор M440 UV (K 254 нм) Спектры ЯМР получены в лаборатории химической и биохимической фармакологии и токсикологии Университета им Рене Декарта (Париж) проф J -P. Girault на приборе Broker AMX500 (H 500 13 МГц и <sup>13</sup>C 125 76 МГц), пробы были ли-пофиллизированы и растворены в D<sub>2</sub>O Масс-спектры с химической ионизацией получены на приборе Riber 10-10B, газ-реагент-аммиак

фитоэкдистероиды 1-11 (схема 1). Из них соединения 7, 9, 10 и 11 оказались новыми фитоэкдистероидами.

Схема 1



26-С-Ацетил-255-инокостерон 9 - основной компонент малополярной фракции сока растений *Serratula coronata* L. Спектры ЯМР \*Н и <sup>13</sup>С показали, что остов молекулы идентичен таковому для 20-гидроксиэкдизона. Изменения в структуре боковой цепи соответствующим образом отражаются следующими особенностями ПМР-спектра: появление синглета ацетильной группы при 2.11 м.д.; обнаружение вместо синглета Me-26 дублет-дублетных сигналов новой группы -CH<sub>2</sub>-O- при 3.95 м.д. (*J* 11.0 и 6.5 Гц) и 4.05 м.д. (*J* 11.0 и 6.0 Гц). Наличие последней подтверждается слабополярным сдвигом сигнала атома С-26 в спектре ЯМР <sup>13</sup>С - на 40 м.д. по сравнению со спектром 20-гидроксиэкдизона. Более того, отсутствие гидроксильной группы при С-25 проявляется в сдвиге сигнала Me-27 в более сильное поле и его трансформацией из синглета в дублет (5 0.96 м.д., *J* 6.9 Гц). В ХИ-МС присутствуют два характерных пика: молекулярного иона с



$m/z$  522 (100%) и иона  $[M+H_2O]^+$  с  $m/z$  540 (83%). 255-Конфигурация выделенного экидстероида установлена, исходя из следующих фактов. Ранее неацетилованный инокостерон был выделен в виде смеси 255- и 25R-эпимеров (2:1) из *Achyranthes fauriei*. В виде индивидуального 255-эпимера его извлекли из *Serratula coronata* L., что было подтверждено данными ВЭЖХ и ЯМР  $^{13}C$ , где наблюдались одиночные сигналы C-22, C-24, C-25, C-26 и C-27 атомов, как и в нашем случае. Из этого можно заключить, что атом C-25 выделенного нами 26-0-ацетилинокостерона также обладает S-конфигурацией

Соединению 7 была приписана структура 22-0-ацетилэкидизона. Его спектры ЯМР \*Н и  $^{13}C$  показали, что основной структурный фрагмент молекулы - это скелет экидизона. В области расположения ацетильных групп (ПМР-спектр) наблюдается синглет с  $\delta$  2.13 м.д. Сигнал Н-22 в ПМР-спектре смещен в более слабое поле вследствие наличия ацетильной группы при C-22, сигнал которого в спектре ЯМР  $^{13}C$  также смещается в слабое поле ( $\delta$  5~2 м.д.) по сравнению со спектром экидизона. Характерные пики в ХИ-МС:  $m/z$  506 (70%)  $[M]^+$ , 507 (56%)  $[M+H]^+$ , 508 (80%)  $[M+2H]^+$ , 524 (100%)  $[M+H_2O]^+$ .

Спектры ЯМР \*Н и  $^{13}C$  экидстероида 10 незначительно изменяются по сравнению со спектрами 20-гидроксиэкидизона, и различия связаны с видоизменениями боковой цепи. Так, сигнал Н-22 в ПМР-спектре сдвигается в слабopольную область ( $\delta$  5-0.4 м.д.). Кроме того, наблюдается появление новых сигналов: квартета при 5.16 (7 5.0 Гц) и дублета при 1.40 м.д. (/ 5.0 Гц). В спектре ЯМР  $^{13}C$  сигналы C-20 и C-22 смещены в более слабое поле ( $\delta$  8~8-9 м.д.), в области  $\delta$  102.5 м.д. присутствует новый сигнал, который следует отнести к появлению ацетального атома углерода. Однозначное отнесение сигналов атомов водорода и углерода группы MeCHOг было сделано с помощью комбинированного анализа  $^1H$  COSY и  $^1H$ - $^{13}C$  PFG-HSQC спектров, которые подтвердили наличие этилиденовой группировки

между С-20 и С-22 атомами анализируемого соединения. Более того, сравнение спектров Я М Р С данного экидстероида с таковыми для заведомо синтезированного показало их идентичность. Характерные пики в ХИ-МС:  $m/z$  507 (24%)  $[M+H]^+$  и 524 (52%)  $[M+H_2O]^+$ . Ацетальный атом углерода является асимметричным, и природный экидстероид 10 выделен в виде смеси *R*- и *S*-эпимеров с содержанием минорного компонента около 15%, о чем свидетельствуют наличие и относительная интенсивность двух минорных Н сигналов при 5.36 (к,  $J$  5.0 Гц) и 1.35 м.д. (д, / 5.0 Гц), которые были "приписаны соответственно СН и СН<sub>3</sub> группам ацетального фрагмента минорного эпимера согласно данным NOESY экспериментов. На основании результатов последних была установлена конфигурация ацетального атома углерода в минорном изомере: в спектре наблюдался сильный NOE эффект от сигнала СН диоксоланового цикла (8 5.36 м.д.) на соседней СН<sub>3</sub>-группе (8 1.35 м.д.) и среднее NOE взаимодействие с Ме-21, что отвечает 5-конфигурации ацетального атома в минорном эпимере. Следовательно, основной эпимер 10 является 20,22-(9-(1Я-этилиден)-20-гидроксвэкидизоном.

При сравнении спектров ЯМР \*Н и <sup>13</sup>С экидстероида 1с таковыми для 20-гидроксиэкидизона были отмечены следующие особенности. В спектре ЯМР Н появляется новый сигнал при 4.20 м.д., коррелирующий (2D COSY-эксперимент) с сигналом Н-9, который проявляется широким дублетом (8 3.11, / 9.0 Гц). Таким образом, сигнал с 8 4.20 следует отнести к аксиальному Н-11 при экваториальной 11-гидроксигруппе. Структурные изменения в боковой цепи (по сравнению с 20-гидроксиэкидизоном) отражаются в спектрах ЯМР<sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С. Смещение сигналов Ме-26 и Ме-27 в область сильного поля (А8-0.3 м.д.) и их трансформация из синглета в дублет свидетельствуют об отсутствии (ОН)-группы при С-25. Наличие этилиденной группы приводит к изменениям, описанным выше для соединения 10. Наличие одного квартета при 5.15 м.д. (7 5.0 Гц) (МеСНО<sub>2</sub>) и одного

дублета при 1.35 мд. ( $J$  5.0 Гц) ( $\text{MeCHO}$ ) позволяет сделать вывод о гомогенности конфигурации ацетального атома углерода выделенного соединения 11, являющегося, аналогично соединению 10, Л-эпимером, а именно 20,22-0-(этидиден)аюгастероном С.

Выделенные нами макистерон С (1), 20,22-ацетониды 20-гидроксиэкдизона (2) и аюгастерона С (3), 2- (4) и 3-ацетаты 20-гидроксиэкдизона (5), витикостерон Е (6) и 22-ацетат полиподина В (8) были идентифицированы сравнением их МС спектров и спектров ЯМР\*Н и  $^{13}\text{C}$  с приведенными в литературе для этих соединений (некоторые небольшие отличия обусловлены тем, что наши образцы были липофилизированы и их спектры сняты в  $\text{D}_2\text{O}$ , тогда как приведенные в литературе спектры были получены в растворе  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  или  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Таким образом, идентифицированные минорные малополярные компоненты *Serratula coronata* L. представляют собой преимущественно конъюгаты (ацетаты или ацетали) фитоэкдистероидов (экдизона, 20-гидроксиэкдизона, полиподина В, аюгастерона С и инокостероя).

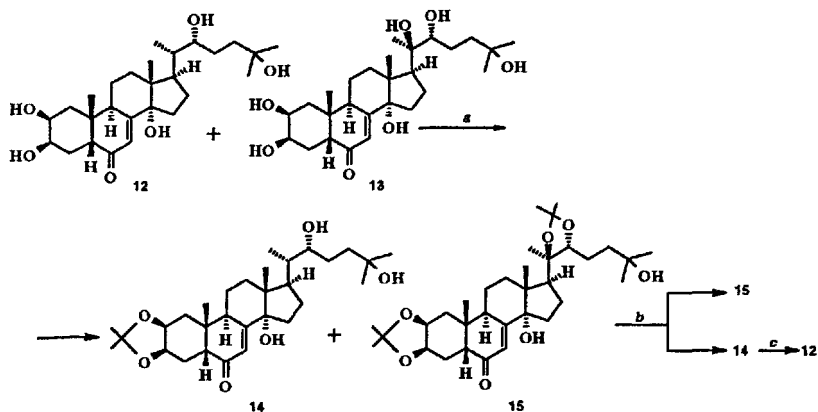
## 2. Получение экдизона из *Serratula coronata* L.

Экдизон (12) является первым гормоном линьки, выделенным из коконов *Bombix mori*. Концентрация этого зооэкдистероида в организме насекомых ничтожно мала (нанограммовые количества). Весьма мало его содержание и в растениях.

Нами было замечено, что выделенный из сока растений *Serratula coronata* L. на стадии вегетации 20-гидроксиэкдизон (20Е) практически не содержал экдизона (Е). С другой стороны, полученный из сока растений, собранных в фазе бутонизации, 20Е содержал до 10% Е. Однако разделить эти два близких по структуре экдистероида с помощью колоночной хроматографии не удалось. Задача была решена путем превращения смеси (1:9) Е и 20Е в соответствующую смесь 2,3-ацетонида Е (14) и 2,3:20,22-диацетонида 20Е (15), легко поделенную на индивидуальные компоненты

с помощью колоночной хроматографии. Последующий гидролиз ацетонида 14 привел к целевому экдизону 12 (схема 2).

Схема 2



Реагенты и условия: a. (Me)<sub>2</sub>CO, ФМК; b. SiO<sub>2</sub>; c. 70% AcOH.

### 3. Новые производные 20-гидроксиэкдизона. Синтез витикостерона $\xi$ и 20,22-O-(1Л-этилиден)-20-гидроксиэкдизона.

Среди идентифицированных нами минорных малополярных компонентов *Serratula coronata* L. были конъюгаты 20-гидроксиэкдизона-25-ацетат (витикостерон E) 6 и 20,22-O-(1Этилиден) производное 10 (новый фитоекдистероид). Нами были предложены схемы синтеза этих соединений.

Витикостерон E известен как минорный компонент экидистероидного состава ряда видов растений. Известно несколько методов его синтеза, основанных на ацетилировании третичной 25-гидроксигруппы 20E после связывания более реакционноспособных 2-, 3- 20- и 22-гидроксильных групп в 2,3:20,22-диацетонид или 2,3-ацетонид-20,22-фенилборонат. Однако, суммарный выход целевого фитоекдистероида в известных методах был невысок, а сам витикостерон E недостаточно охарактеризован. Основная проблема его синтеза заключается в проведении селективного гидролиза ацетонидных групп с сохранением 25-ацетатной группы. В этой связи,

для выбора наиболее приемлемой схемы синтеза целевого соединения был получен ряд новых производных 20-гидроксиэкдизона 13 (схема 3).

Нами найдены условия взаимодействия соединения 13 с ацетальдегидом в присутствии фосфорномолибденовой кислоты (РМА), когда образуется конфигурационно однородный 2,3:20,22-бисацеталь 16, что подтверждается двумя одиночными сигналами 20,22- и 2,3-ацетальных групп в спектре ЯМР<sup>13</sup>С (8 101.0 и 101.4 м.д. для С-Г и С-1" соответственно) и наличием только двух квартетов (*J* 5 Гц) протонов при С-ГиС-1" в спектре ЯМР<sup>2</sup>Н (растворитель — CDCb) (8 5.04 и 5.09 м.д. соответственно) (исчезающе малые квартетные сигналы, обнаруживаемые при 8~5.25 и 5.36 м.д., свидетельствуют, что возможные примеси диастереоизомеров по С-Г и С-1" хиральным центрам не превышают 10%). Гидролизом бисацетала 16 получен конфигурационно однородный 20,22-ацеталь 10 (в спектре ЯМР<sup>13</sup>С присутствует одиночный сигнал атома С- при 8 101.1, а в спектре ЯМР<sup>1</sup>!! - квартет с 8 5.04 (/ 5 Гц) (едва заметный квартет с 8 5.25 свидетельствует о присутствии примеси другого эписмера, не превышающей 10%%)). Из 2D NOESY-эксперимента, показавшем слабый NOE-эффект от НС-Гна протонах НЗС-18 и полное отсутствие NOE-корреляции с НЗС-21, можно заключить, что атом С-1' в полученном 20,22-ацетале имеет конфигурацию, которой отвечает расположение более объемной группы СНз (в сравнении с атомом водорода) с пространственно менее затрудненной стороны 20,22-диоксоланового цикла. Таким образом, синтезированный 20,22-ацеталь идентичен выделенному из *Serratula coronata* L. 20,22-О-(1Л-этилиден)-20-гидроксиэкдизону 10.

Взаимодействием соединения 13 с метилэтилкетонем, ацетилацетоном и фурфуролом получены смеси соответствующих моно- (17-19) и диацеталей (20-22), которые были разделены с помощью колоночной хроматографии. Образование циклических ацеталей по 2,3- и 20,22-гидроксильным группам отражается в их спектрах ЯМР<sup>13</sup>С слабополюсным смещением сиг-

налов атомов С-2, С-3, С-20 и С-22, а также появлением сигналов ацетальных атомов углерода в области 8 105-110 м.д. (для соединений 19 и 22 - 95-97 м.д.)- В спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  соединений 17,18 и 20,21, полученных при взаимодействии соединения 13 с метилэтилкетонем и ацетилацетоном, сигналы 20,22-ацетальных атомов - одиночные, следовательно они конфигурационно однородны, тогда как сигналы 2,3-ацетальных атомов соединений 20 и 21 удвоены, что свидетельствует об их диастереомерном характере. Частичный гидролиз бисацеталей 20, 21 приводит к соответствующим хирально однородным 20,22-моноацеталам 17, 18, имеющих, по видимому, конфигурацию, которой отвечает расположение более объемистых групп  $\text{R}^2$  с пространственно менее затрудненной стороны диоксоланового цикла.

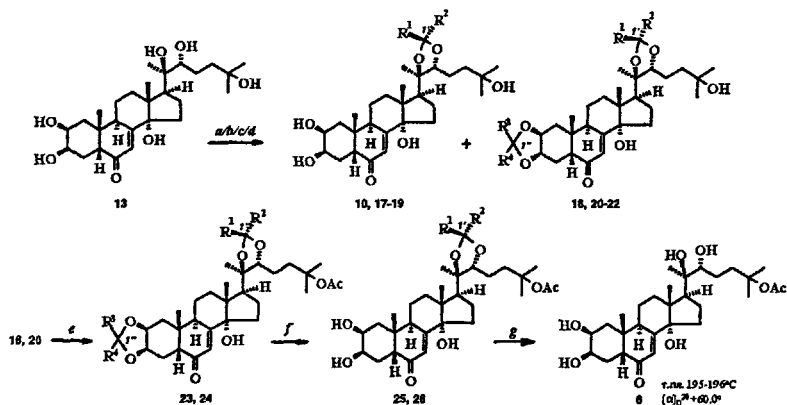
Более сложная ситуация наблюдается в спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  ацеталей 19 и 22, полученных взаимодействием 13 с фурфуролом, что обусловлено, по видимому, не только образованием хиральных атомов С-Г и С-1" 1,3-диоксолановых циклов, но и возможностью различной ориентации фуранового цикла по отношению к циклу 1,3-диоксолана. Вследствие этого после превращения бисацетала 22 в 20,22-ацеталь 19 в области ацетальных атомов углерода в спектре моноацетала присутствуют 2 сигнала. Удвоение сигналов в спектре ацетала 19 наблюдается также для атомов С-17, С-20 и С-22.

Поскольку из синтезированных бисацеталей кислотный гидролиз до экистероида 13 наиболее гладко протекал в случае бисацеталей 16 и 20, дальнейшие трансформации в целевой витикостерон Е 6 выполнялись с этими соединениями. Продолжительное выдерживание каждого из них с уксусным ангидридом и пиридином в присутствии DMAP привело к 25-ацетатам 23 и 24 соответственно. Действием 70%-ной  $\text{AcOH}$  соединения 23 и 24 легко превращены в соответствующие моноацетали 25 и 26, дальнейший гидролиз ( $\text{AcOH} - \text{ZnCb}$ ) каждого из которых привел к целевому фи-

тоэкистероиду 6. Суммарный выход витикостерона E в расчете на диацетали 16 и 20 составил 84 и 35% соответственно.

Для сравнения был выполнен синтез витикостерона E традиционным путем через диацетонид 15, при этом выход целевого соединения составил 32%. Следовательно, наиболее рациональным представляется синтез витикостерона E 6 по маршруту 16→23→25→6 (схема 3).

Схема 3



$R^1=H$  (10, 16, 19, 22, 23, 25), Me (17, 18, 20, 21, 24, 26);  
 $R^2=Me$  (10, 16, 23, 25), Et (17, 20, 24, 26), MeCOCH<sub>2</sub> (18, 21), 2-фурил (19, 22);  $R^3=H$  (16, 22, 23), Me (20, 21, 24);  
 $R^4=Me$  (16, 23), Et (20, 24), MeCOCH<sub>2</sub> (21), 2-фурил (22).

Реагенты и условия: a. CH<sub>3</sub>CHO/ФМК, 2°C, 72 ч (для соединений 10, 16); b. CH<sub>3</sub>COCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>/ФМК, 25°C, 0.25 ч (для соединений 17, 20); c. CH<sub>3</sub>COCH<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>/ФМК, 25°C, 1 ч (для соединений 18, 21); d. фурфурол/ФМК, 25°C, 24 ч (для соединений 19, 22); e. Ac<sub>2</sub>O / Py – DMAP; f. 70%-ная AcOH; g. 70%-ная AcOH / ZnCl<sub>2</sub>.

Таким образом, на основе трансформаций производных 20-гидроксиэкидона предложены эффективные синтезы минорных компонентов *Serratula coronata* L. – витикостерона E и нового фитоэкистероида – 20,22-O-(1R-этилиден)-20-гидроксиэкидона.

#### 4. Оксимирование 20-гидроксиэкдизона и его диацетонида: конфигурация б-оксимов и их 14,15-ангидропроизводных.

В последнее время проявляется повышенный интерес к стероидным оксима, обусловленный тем, что оксимы, выделенные из морских губок *Cynachyrella alloclada* и *C. apion*, проявили ингибирующую активность по отношению к ароматазе и, следовательно, являются потенциальными противоопухолевыми средствами. Оксимы 20-гидроксиэкдизона и его производных в литературе не описаны. Есть лишь упоминание, что производные по карбонильной группе 20-гидроксиэкдизона обладают большей по сравнению с ним противоопухолевой активностью.

Взаимодействием диацетонида 20-гидроксиэкдизона **15** с солянокислым гидроксиламином в пиридине и последующей нейтрализацией реакционной смеси спиртовым раствором едкого кали получена эквимольная смесь изомерных оксимов - (*Z/E*-2*T*) (схема 4), что следует из соотношения интенсивностей дублетов ( $\nu$  2 Гц) Н-7 с 8 5.95 (*Z*-изомер) и 6.61 м.д. (*E*-изомер) в спектре ЯМР  $^1\text{H}$ . Сигнал Н-7 *E*-изомера находится в более слабом поле по отношению к соответствующему сигналу *Z*-изомера **27** вследствие влияния находящегося в близком соседстве фрагмента NO гидроксиминной группы.

Обработкой смеси оксимов (*2YE*)-**27** (трифторметил)триметилсиланом и тетрабутиламмонийфторидом получена смесь (1:1) 14,25-бис(триметилсилиловых) эфиров *Z*- и изомерных оксимов **28** (**Z-28** и *E*-**28**). Колоночной хроматографией выделены оксимы **Z-28** (примесь *E*-изомера <10%) и *E*-**28** (примесь *Z*-изомера < 5%) [из соотношения интенсивностей сигналов Н-7 с 8 5.88 (*Z*-изомер) и 6.56 (*E*-изомер)].

Если реакционную смесь после оксимирования диацетонида **15** в пиридине не подвергать обработке щелочью, то получают эквимольную смесь (разделена с помощью колоночной хроматографии) соответствующего ок-



сима (конфигурации  $\epsilon$ -27 (содержание *Z*-изомера < 5%, из соотношения интенсивностей сигналов с  $\delta$  6.61 и 5.95 м.д.) и 7,14-диенового 6-оксима (*Z*)-конфигурации *Z*-29 [содержание  $\epsilon$ -изомера < 5%, из соотношения интенсивностей сигналов с  $\delta$  6.21 (H(7) в *Z*-изомере) и 6.83 м.д. (H(7) в  $\epsilon$ -изомере)]. Структура диенового оксима *Z*-29 подтверждается обнаружением в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  сигналов  $8p^2$ -гибридизованных атомов углерода с  $\delta$  139.5 (C-14) и 116.7 м.д. (C-15). Как видно, при такой обработке реакционной смеси протекает дегидратация, которой подвергается только *Z*-изомерный оксим *Z*-27, тогда как изомер  $\epsilon$ -27 сохраняется.

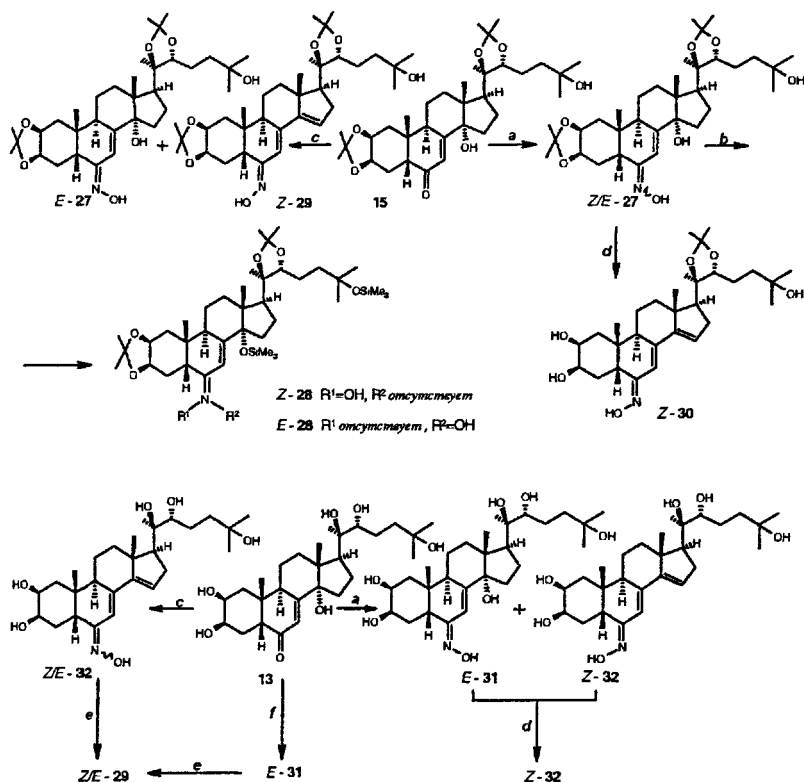
С другой стороны, смесь изомерных оксимов (*Z/E*)-21 нацело превращается в диеновый оксим конфигурации при выдерживании в растворе метанола, содержащего РМА. При этом происходит деблокирование 2,3-гидроксигрупп и единственным продуктом реакции оказывается оксим *Z*-30. По-видимому, в приведенных условиях имеет место изомеризация оксима  $\epsilon$ -27 в *Z*-изомер, который далее дегидратируется. Уместно отметить, что в ацетоне в присутствии РМА смесь (*Z/E*)-21 не изменяется.

Привзаимодействии 20-гидроксиэксидона 13 с  $\text{NFbOH} \cdot \text{HCl}$  в пиридине и последующей нейтрализацией  $\text{KOH} \cdot \text{EtOH}$  образуется смесь оксимов  $\epsilon$ -31 и *Z*-32 в соотношении  $\sim 1:2.5$  (из соотношения интенсивностей сигналов H-7 с  $\delta$  6.56 ( $\epsilon$ -31) и 6.17 (*Z*-32)). По-видимому, в случае оксимирования 13, в отличие от диацетонида 15, при этих условиях обработки реакционной смеси часть изомера  $\epsilon$ -31 первоначальной, вероятно эквимольной, смеси *Z/E*-31 превращается в *Z*-31. В итоге получается смесь оксимов  $\epsilon$ -31 и *Z*-32 с существенным преобладанием последнего. Полученная смесь (1:2.5) оксимов  $\epsilon$ -31 и *Z*-32 нацело переходит в единственный продукт - диеновый оксим *Z*-32 при обработке метанольным раствором в присутствии РМА.

Если продукт оксимирования соединения 13 в пиридине не нейтрализовать, то при выделении получают смесь диеновых оксимов *Z*-32 и  $\epsilon$ -32 в

соотношении -2.5:1 (из соотношения интенсивностей сигналов Н-7 с 8 6.17 и 6.78 м.д), то есть, в отличие от оксимов 27, в случае оксимов 31 дегидратироваться может, вероятно, не только *Z*-, но и *ii*-изомер, хотя и менее легко. В итоге получается смесь диеновых оксимов *Z/E*-32 с существенным преобладанием *Z*-изомера. Интересно, что при оксимировании 13 в этаноле в присутствии NaOH единственным продуктом оказывается оксим *E*-31. К сожалению, из-за плохой растворимости диацетонида 15 в этаноле провести его оксимирование в тех же условиях не удалось.

#### Схема 4



**Реагенты и условия:** *a.*  $NH_2OH \cdot HCl/Py$ , затем  $KOH/EtOH$ ; *b.*  $CF_3SiMe_2/TBAF$ , затем  $SiO_2$ ; *c.*  $NH_2OH \cdot HCl/Py$ ; *d.*  $MeOH/PMA$ ; *e.*  $Me_2CO/PMA$ ; *f.*  $NH_2OH \cdot HCl/NaOH, EtOH$ .

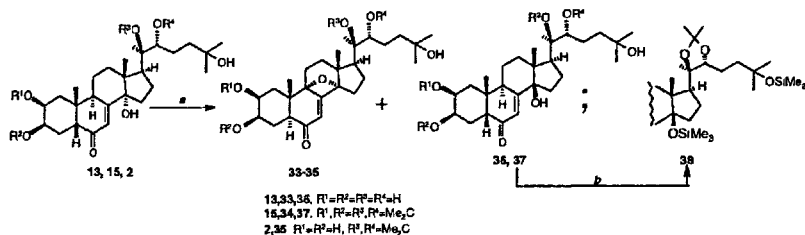
В условиях ацетонирования экидстероидов смесь диеновых оксимов *ZIE-32* была превращена в смесь соответствующих диацетонидов *ZIE-29* того же изомерного состава. С другой стороны, ацетонирование индивидуального оксима **31** дало смесь изомерных диацетонидов диеновых оксимов **Z-29** и **£-29** (1.5:1, из соотношения интенсивностей сигналов с 8 6 21 и 6.83 м.д.).

### **5. Необычные трансформации 20-гидроксиэкидзона и его ацетонидов в растворах щелочных металлов в жидком аммиаке.**

Восстановление ненасыщенных кетонов под действием щелочных металлов в жидком аммиаке находит применение в химии стероидов для селективного восстановления двойной связи А<sup>7</sup>-6-кетогруппировки. Однако, в ряду экидстероидов эта реакция не исследовалась.

Нами обнаружено, что при взаимодействии 20-гидроксиэкидзона **13**, его ди- **15** и 20,22-моно-**2** ацетонидов со щелочными металлами в жидком аммиаке вместо ожидаемых продуктов восстановления А<sup>7</sup>-связи образуются соединения с кислородным мостиком между атомами С-9 и С-14, или оксетаны **33-35** соответственно. В случае соединений **13** и **15** выделены также 14(3-эпимеры исходных экидстероидов - соединения **36** и **37** соответственно. При этом, диацетонид **15** под действием Li-ж.МНз превращается главным образом (>90%) в оксетан **34**, тогда как его взаимодействие с Na-ж.гШз приводит почти исключительно к 14(3-эпимеру **37**. С другой стороны, при взаимодействии **13** с Ы-ж.гШз образуется смесь (-1:1) оксетана **33** и 14(3-эпимера **36**, тогда как действие на **13** Na-ас.ННб приводит к сложной смеси продуктов. В то же время, взаимодействие моноацетонида **2** с Na-ж.гШз даёт исключительно оксетан **35** (схема 5).

## Схема 5



**Реагенты и условия:** *a.* Me (Li или Na), ТГФ, NH<sub>3</sub>, - 33°C; *b.* CF<sub>3</sub>SiMe<sub>3</sub>-ТВАФ.

О превращении 13,15,2 в соответствующие оксетаны 33-35 свидетельствует наблюдаемый в спектрах ЯМР <sup>13</sup>C значительный слабопольный сдвиг сигнала C-9 (A5-58 м.д.) и его трансформация из дублета в синглет (режим JMOD). В результате образования оксетанового цикла наблюдаются существенные сдвиги сигналов C-14 и других углеродных атомов, близко расположенных к кислородному мостику. Спектры ЯМР \*Н оксетанов 33-35 также заметно изменяются в сравнении с соответствующими спектрами исходных экистероидов. В частности, в спектрах каждого из соединений 33-35 отсутствует сигнал Н-9, и вследствие этого сигнал Н-7 из дублета (<sup>4</sup>/~2.0 Гц) становится синглетом, смещаясь в сильное поле (Д8 0.1-0.2 м.д.). Кислород оксетанового цикла оказывает дезэкранирующее влияние на Me-18, сигнал которого смещается в слабое поле по отношению к соответствующему сигналу в спектре 2 (Д8 0.5 м.д.). Посредством 1D и 2D ЯМР экспериментов\* установлено, что соединение 34 является 2,3:20,22-диацетонидом 9αД4а-окса-14-дезоксидеокси-5α-20-гидроксиэкизона. Поскольку спектры ЯМР <sup>13</sup>C экистероидов 33 и 35 подобны спектру ЯМР <sup>13</sup>C 34, то им также следует приписать структуру 9ос,14а-окса-5ос-экистероидов.

\* Эксперименты 1D и 2D ЯМР выполнены в лаборатории проф. J.-P. Granlt на приборе Bruker AMX 500, растворитель- CDCl<sub>3</sub>.

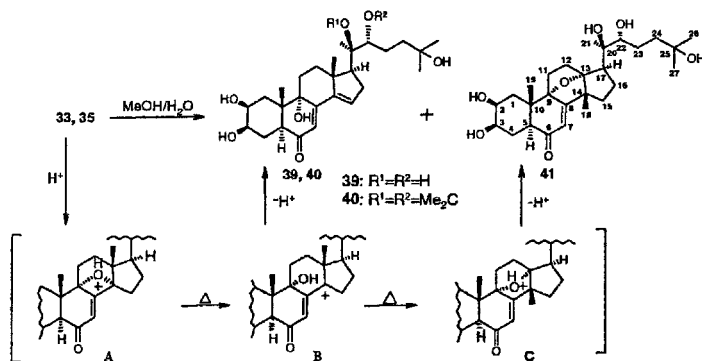
Для 14|3-Э1шмеров 20-гидроксиэкдизона 36 и его диацетонида 37 характерен слабopольный сдвиг сигнала С-14 по отношению к таковому в спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  исходных 14а-экдистероидов (AS-11 м.д.). В меньшей степени смещаются сигналы близко расположенных к С-14 атомов С-7, С-8, С-13, С-15, тогда как другие почти не меняют своего положения в спектрах. Такого же рода изменения наблюдаются в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  бис(триметилсилильного) производного 38, полученного обработкой 14(3-диацетонида 37  $\text{CF}_3\text{SiMe}_3\text{-Bu}_4\text{N}^+\text{F}$ , в сравнении со спектром синтезированного ранее диацетонида 14,25-бис-0-(триметилсилил)-20-гидроксиэкдизона. Эпимеризация Н-5 не наблюдалась в случае образования 14р-эпимеров 36 и 37, о чем можно судить по почти полному совпадению химических сдвигов С-1, С-2, С-3, С-4, С-5, С-10 и С-19 атомов соединений 13 и 36,15 и 37 в спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$ . В спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  сигналы Н-2, Н-3, Н-19 этих экдистероидов также попарно идентичны, тогда как известно, что в случае 5 и 5ос-эпимеров сигналы соответствующих протонов значительно различаются своим относительным положением в спектрах.

Структуры соединений 33-37 подтверждены масс-спектрами высокого разрешения.

Продолжительное выдерживание оксетанов 33 и 35 в водном метаноле приводит к 9а-гидрокси-5а-стахистерону В 39 и его 20,22-ацетониду 40 соответственно (схема б), что однозначно следует из сравнения их спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  со спектрами заведомых стахистерона В и его 20,22-ацетонида. Наиболее существенное различие сравниваемых спектров, обусловленное 9а-гидрокси группой в 39 и 40, состоит в смещении сигнала С-9 в слабое поле ( $\Delta\delta \sim 35$  м.д.) и трансформации его из дублета в синглет. Заметно смещены в слабое поле также сигналы С-11 и С-12 в спектрах соединений 39 и 40 ( $\Delta\delta \sim 5-9$  м.д.). В спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  этих соединений отсутствует сигнал Н(9), а сигнал Н(7) становится синглетным. Атом Н-5 эк-

дистероидов **39** и **40** занимает (X-положение, об этом свидетельствует изменение порядка выхода сигналов H-2 и H-3, относительно их взаимного местоположения в спектрах ЯМР \*H 5[3-эпимеров. Структуры **39** и **40** подтверждены масс-спектрами высокого разрешения.

Схема 6



В качестве продукта изомеризации оксетана **33** в водном метаноле наряду с 9а-гидрокси-5а-стахистероном **В 39** выделен 9аД3ос-окса-13-деметил-14[3-метил-14-дезоксидеокси-5а-20-гидроксиэксидон **41**. В это же соединение оксетан **33** превращается в условиях проведения ВЭЖХ (элюент- $\text{MeONH}_2/\text{H}_2\text{O}$ ). Отнесение сигналов в спектрах ЯМР \*H и  $^{13}\text{C}$  (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ) и установление структуры соединения **41** выполнено с помощью Ш и 2D экспериментов ЯМР. Масс-спектры высокого разрешения оксапроизводных **33** и **41** почти идентичны, различия - в соотношении интенсивностей пиков.

Наблюдаемая изомеризация оксетанов **33** и **35** в соединения **39-41** протекает, вероятно, через оксониевый ион **A**, который переходит в карбокатион **B** (схема 6). Дальнейшие трансформации возможны по двум направлениям. Отщепление протона от C-15 приводит к соединениям **39** и **40**. Альтернативный путь превращения карбокатиона **B** вызван 1,2-сдвигом метильной группы от C-13 к C-14 в карбокатионе **B** с образованием кисло-

родного мостика между С-9 и С-13 атомами. Оксоний-катион С в результате депротонирования превращается в 9ДЗ-оксопроизводное 41.

### Выводы

1. Впервые исследованы малополярные компоненты экидистероидного состава *Serratula coronata* L, выделено и идентифицировано 11 фитоэкидстероидов, из них 2- и 3- ацетаты 20-гидроксиэкидизона, 22-ацетат полиподина В, 20,22-ацетонид аюгастерона С впервые получены из данного вида растений, а 22- $\alpha$ -ацетилэкидизон, 26-О-ацетил-255-инокостерон, 20,22-(9-(1/?-этилиден)-20-гидроксиэкидизон и 20,22-0-(1#-этилиден)аюгастерон С являются новыми экидстероидами.
2. Синтезированы новые производные 20-гидроксиэкидизона - циклические ацетали по 2,3:20,22-гидроксильным группам. На основе направленных трансформаций 20-гидроксиэкидизона синтезированы витикостерон Е и 20,22-О-(1/?-этилиден)-20-гидроксиэкидизон-минорные малополярные компоненты фитоэкидстероидов *Serratula coronata* L.
3. В результате исследования реакции оксимирования разработаны высокостереоселективные методы синтеза (6)-ОКСНМОВ 20-гидроксиэкидизона и его диацетонида, а также 14,15-ангидропроизводных оксимов конфигурации.
4. Обнаружено, что в реакции 20-гидроксиэкидизона и его ацетонидов с растворами щелочных металлов в жидком аммиаке образуются 9ос,14ос-оксапроизводные 5а-экидстероидов. Наряду с оксетанами получены 14р-эпимерные экидстероиды. В водном метаноле оксетаны изомеризуются с образованием 9а-гидрокси-14Д5-ангидро-5а-20-гидроксиэкидизонов. Более глубокая структурная перестройка оксетана из 20-гидроксиэкидизона, вызванная смещением связи С-0 от С-14 к С-13 атому и сопровождающаяся 1,2-сдвигом метильной группы от

С-13кС-14атому, приводит к 9а,13а-окса-13-деметил-14Р-метил-14-дезоксиде-5а-20-гидроксиэкдизону.

5. Разработан метод получения редкого природного зоо- и фитоэкдистероида - экдизона, включающий стадии выделения из сока свежесобранных на стадии бутонизации растений *Serratula coronata* L. смеси (~1:9) экдизона и 20-гидроксиэкдизона, превращения ее в соответствующую смесь ацетонида экдизона и диацетонида 20-гидроксиэкдизона, разделения её с помощью колоночной хроматографии и последующего гидролиза 2,3-ацетонида экдизона.

**Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:**

1. Галяутдинов И.В., Веськина Н.А., Одинокоев В.Н. Неожиданные трансформации 20-гидроксиэкдизона и его ацетонидов с образованием оксетанового цикла. // В кн. *Химия и биологическая активность синтетических и природных соединений; кислород- и серусодержащие гетероциклы*. Москва, IBS Press. - 2003. - Т. I. - С. 222-224.
2. Галяутдинов И.В., Назмеева С.Р., Савченко Р.Г., Веськина Н.А., Недопекин Д.В., Фатыхов А.А., Халилов Л.М., Одинокоев В.Н. Новые производные 20-гидроксиэкдизона. Синтез витикостерона Е. // *ЖОРХ*. - 2004. - Т. 40. - Вып. 5. - С. 709-717.
3. Одинокоев В.Н., Галяутдинов К.В., Веськина Н.А., Яшина Е.А. Способ получения ос-эксдизона // Заявка № 2003132280. Решение о выдаче патента на изобретение от 18.11.03.
4. Галяутдинов И.В., Веськина Н.А., Одинокоев В.Н. 2,3:20,22-Диацетонид (9-О-14-дегидро)-9,14-окса-20-гидроксиэксдизон. // Труды второй международной конференции "Химия и биологическая активность кислород- и серусодержащие гетероциклов". Москва, 2003. Т.2. С. 272.



5. S.R. Nazmeeva, N.A. Veskina, D.V. Nedopekin, I.V. Galyautdinov, R.G. Savchenko, V.N. Odionokov. New acetals of 20-hydroxyecdysone in the viticosterone E synthesis. // *International Conference on Natural Products: Chemistry, Technology & Medicinal Perspectives*. Almaty-Kazakhstan. Abstracts, 2003. P. 137.
6. I.V. Galyautdinov, N.A. Veskina, D.V. Nedopekin, L.M. Khalilov, V.N. Odionokov, S.Kumpun, N. Evrard-Tedeschi, J.-P. Girault, L. Dinan, R. Lafont. Phytoecdysteroids from *Serratula coronata* L. juice. // *International Conference on Natural Products: Chemistry, Technology & Medicinal Perspectives*. Almaty-Kazakhstan. Abstracts, 2003. P. 138.
7. Галяутдинов И.В., Вёскина Н.А., Халилов Л.М., Одинокоев В.Н. Трансформации экистероидов под действием щелочных металлов в жидком аммиаке. // Тезисы докладов *XVII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии*. Казань, 2003. Т.1. С.218.
8. Одинокоев В.Н., Галяутдинов И.В., Вёскина Н.А. Оксимы 20-гидроксиэкидизона и его ацетонидов и их 14,15-ангидропроизводные - потенциальные противоопухолевые средства. // Тезисы докладов *IV Всероссийского научного семинара и Молодежной научной школы "Химия и медицина. Проблемы создания новых лекарственных средств"*. Уфа, 2003. С. 91.
9. Вёскина Н.А., Галяутдинов И.В., Халилов Л.М., Одинокоев В.Н., Dinan L., Lafont R. Новые экистероиды из *Serratula coronata* L. // Тезисы докладов *Молодёжной научной школы-конференции "Актуальные проблемы органической химии"*. Новосибирск, 2003. Д195.
10. Вёскина Н.А. Неожиданные трансформации 20-гидроксиэкидизона и его ацетонидов в растворе щелочных металлов в жидком аммиаке. Синтез новых экистероидов. // Материалы II конкурса научных работ молодых ученых и аспирантов УНЦ РАН и АН РБ. Уфа, 2003. СЛ4.

- П. Воськина НА., Галяутдинов И. В., Халилов Л. М., Одинокое В. Н. (62)- и (6ε)- Оксимы 20-гидроксиюкдизона и его диацетонида и их 14,15-ангидропроизводных // Тезисы докладов *Международной научно-технической конференции "Перспективы развития и практического применения алициклических соединений"*. Самара, 2004. С. 97.
12. Галяутдинов И. В., Воськина НА., Халилов Л. М., Одинокое В. Н. Оксетаны и 14р-эпимеры из реакции 20-гидроксиюкдизона и *сто* ацетонидов с растворами щелочных металлов в жидком аммиаке // Тезисы докладов *Международной научно-технической конференции "Перспективы развития и практического применения алициклических соединений"*. Самара, 2004. С. 106.

Автор выражает благодарность д.х.н., проф. **Халилову ЛМ.** за активное участие в обсуждении спектральных данных при установлении структуры новых соединений, член-корр. РАН **Джемилеву У.М.** за проявленный интерес к работе.

Соискатель:

*Воськина*

**Издательская лицензия Б848184 от 21.04.99 г.  
Подписано в печать 12,11.2004. Бумага офсетная.  
Формат 60xS4'/<sub>к</sub>. Гарнитура «Тайме».**  
**Усл.печ.л. 1,34. Печать методом ризографии. Тираж 115 экз. Заказ 04-12.**

**Отпечатано в типографии ГУЛ НИИБЖД РБ  
450005, Республика Башкортостан,  
г. Уфа, ул.8 Марта, 12/1.**

№24144

396