

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
“ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ”**

**ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ ЭКОЛОГИИ им. М. ПЛАНКА**

УДК 547.92.057

На правах рукописи

**Антончик Андрей Петрович**

**СИНТЕЗ ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ  
24 $\alpha$ -МЕТИЛБРАССИНОСТЕРОИДОВ. ИССЛЕДОВАНИЕ  
БИОСИНТЕЗА БРАССИНОЛИДА**

02.00.10 – Биоорганическая химия  
Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научные руководители:  
чл.- корр. НАН Беларуси  
д.х.н. проф. В.А. Хрипач,  
доктор Б. Шнайдер

Минск 2005

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	<b>4</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>5</b>
<b>ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ</b> .....	<b>6</b>
<b>1. БИОСИНТЕЗ СТЕРОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1. Биосинтез сквалена</b> .....	<b>11</b>
1.1.1. Биосинтез диметилаллилпирофосфата через мевалоновую кислоту .....	11
1.1.2. Биосинтез диметилаллилпирофосфата через 1-дезоксид-Д-ксилозу-5-фосфат .....	12
1.1.3. Биосинтез сквалена .....	13
<b>1.2. Циклизация сквалена</b> .....	<b>15</b>
1.2.1. Биосинтез ланостерина и циклоартенола .....	15
1.2.2. Биосинтез кукурбитацинов .....	18
1.2.3. Биосинтез эуфола .....	18
1.2.4. Биосинтез других тритерпенов .....	19
<b>1.3. Модификация продуктов циклизации 2,3-эпоксисквалена</b> .....	<b>20</b>
1.3.1. Биосинтез лимоненоидов и кассиноидов .....	20
1.3.2. Биосинтез фитостеринов .....	21
1.3.2.1. Биосинтез ситостерина и стигмастерина .....	23
1.3.2.2. Разветвления в биосинтезе боковой цепи фитостеринов .....	26
1.3.3. Биосинтез фитоэкидистероидов .....	26
1.3.4. Биосинтез brassinosteroidов .....	28
1.3.5. Биосинтез сапогенинов и стероидных алкалоидов .....	31
1.3.6. Биосинтез витанолидов .....	32
1.3.7. Биосинтез прогестинов .....	32
1.3.8. Биосинтез карденолидов .....	33
1.3.9. Биосинтез буфадиенолидов .....	33
1.3.10. Биосинтез витаминов D .....	34
<b>2. СИНТЕЗ ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ 24<math>\alpha</math>-МЕТИЛБРАССИНОСТЕРОИДОВ. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА БРАССИНОЛИДА</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1. Синтез C<sup>22</sup>-альдегидов</b> .....	<b>36</b>
2.1.1. Синтез (20 <i>S</i> )-6 $\beta$ -метокси-20-формил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -прегнана ...	38
2.1.2. Синтез (20 <i>S</i> )-6-(1,3-диоксолан-2-ил)-20-формил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -прегнана .....	39

2.1.3. Синтез (20S)-3,6-ди(1,3-диоксолан-2-ил)-20-формил-5 $\alpha$ -прегнана .....	40
<b>2.2. Синтез стероидов растений .....</b>	<b>41</b>
2.2.1. Синтез кампестерина .....	42
2.2.2. Синтез brassinоида .....	44
<b>2.3. Синтез дейтерированных стероидов .....</b>	<b>46</b>
2.3.1. Формирование боковой цепи дейтерированных стероидов .....	46
2.3.2. Синтез дейтерированных 23-дезоксистероидов .....	48
2.3.3. Синтез дейтерированных оксистероидов .....	51
2.3.4. Синтез (22R,23R)-диоксипроизводных .....	53
<b>2.4. Исследование биосинтеза brassиностероидов .....</b>	<b>58</b>
2.4.1. Особенности проведения биосинтетических экспериментов .....	58
2.4.2. Выделение фракции растительного материала, содержащей brassиностероиды .....	59
2.4.3. ГХ-МС анализ brassиностероидов .....	62
2.4.4. ВЭЖХ-МС анализ brassиностероидов .....	65
2.4.5. Исследование биосинтеза brassиностероидов в <i>Arabidopsis thaliana</i> и <i>Lycopersicum esculentum</i> .....	66
2.4.6. Исследование биосинтеза brassиностероидов в <i>Secale cereale</i> ...	69
<b>3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....</b>	<b>77</b>
3.1. Синтез brassиностероидов.....	77
3.2. Исследование биосинтеза brassиностероидов .....	112
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>120</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>121</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Наименования:

$^{13}\text{C}$ ЯМР	ядерный магнитный резонанс на $^{13}\text{C}$
$^1\text{H}$ ЯМР	ядерный магнитный резонанс на $^1\text{H}$
Jones	окисление по Джонсу
Sarett	окисление по Саретту
Swern	окисление по Сверну
ВРМС	масс-спектрометрия высокого разрешения
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС	высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия
ГХ-МС	газожидкостная хроматомасс-спектрометрия
ИК	инфракрасная спектроскопия
КССВ	константа спин-спинового взаимодействия
ПМР	ядерный магнитный резонанс на $^1\text{H}$
ЭУ-МС	масс-спектр, полученный методом электронного удара

Группировки:

Ac	ацетил	P	фосфат
Bu	бутил	Ph	фенил
Et	этил	THP	тетрагидропиранил
Me	метил	TMS	триметилсилил
Ms	мезил	Ts	4-толуолсульфонил (тозил)

Реагенты и растворители:

ADP	аденозинпирофосфат	mCPBA	<i>m</i> -хлорнадбензойная кислота
ATP	аденозинтрифосфат	MsCl	мезилхлорид
BSTFA	N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамид	MSTFA	N-метил-N-(триметилсилил)-трифторацетамид
CoA	кофермент А	NADPH	никотинамидаденин-динуклеотид фосфат
DHP	дигидропиран	Pu	пиридин
DIBAL-H	диизобутилалюмогидрид	THF	тетрагидрофуран
DMAPP	диметилаллилпирофосфат	TMP	2,2,6,6-тетраметилпиперидин
DMF	N,N-диметилформамид	TsCl	тозилхлорид
DMSO	диметилсульфоксид	TsOH	4-толуолсульфоукислота
IPP	изопренилпирофосфат		
MBA	метилборная кислота		

## ВВЕДЕНИЕ

Еще в 1940-е годы была высказана догадка о том, что в растениях можно обнаружить стероидные регуляторы роста. В многочисленных биотестах растения подвергали обработке гормонами животных, которые оказывали физиологическое действие. Однако, их приходилось использовать в слишком высоких концентрациях, и вряд ли можно было говорить о специфичности полученных результатов. Выделить физиологически активные стероиды из растений долгое время не удавалось. Однако попытки выделить фитогормоны стероидной природы не прекращались. В 1970 г. американские ученые обнаружили, что масляный экстракт из пыльцы рапса стимулировал рост проростков в длину. Позднее из 40 кг пыльцы рапса выдели всего 4 мг действующего вещества стероидного происхождения. От латинского названия рапса (*Brassica napus*) вещество было названо brassинолидом, а все соединения, имеющие сходное строение, называют brassиностероидами.

Brassinостероиды регулируют рост и развитие растений. На молекулярном уровне brassиностероиды изменяют экспрессию генома и метаболизм нуклеиновых кислот и белков. Обработка растений brassиностероидами на соответствующей стадии развития приводит к увеличению урожая и, в ряде случаев, к улучшению его качества. Замечательно, что эти эффекты могут быть достигнуты при дозах в 5-50 мг/га, что намного меньше, чем в случае традиционно применяемых средств повышения урожайности растений. Для практического применения brassиностероидов большое значение имеет также их способность увеличивать устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды, включая экстремальные температуры, засуху, засоление, обработку пестицидами.

К числу важнейших проблем, связанных с сельскохозяйственным применением brassиностероидов, относится высокая вариабельность их эффекта, зависящая от вида растений и условий применения препаратов. Возможный путь к ее решению состоит в выяснении видоспецифических особенностей биосинтеза brassиностероидов, различия в котором могут служить причиной указанной вариабельности. Расшифровка деталей механизма биосинтеза и выявление специфических структурных типов brassиностероидов ответственных за биоэффект у конкретного биологического вида, позволяет обеспечить целенаправленное воздействие на рост и развитие сельскохозяйственных растений.

Настоящее исследование посвящено разработке методов масштабируемого синтеза труднодоступных brassиностероидов и изучению особенностей биосинтеза данного класса соединений.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы диссертации.** С открытием стероидных гормонов растений начался новый этап развития химии стероидов. Исследования brassinosterоидов приобретают большое значение ввиду перспективности соединений данного класса. Препараты, действующими веществами которых являются природные brassinosterоиды и их аналоги, находят все более широкое применение в сельском хозяйстве. Например, препарат ЭПИН, разработанный в Лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси, является препаратом нового поколения, предназначенным для повышения урожайности и качества сельскохозяйственной продукции и повышения устойчивости культур к неблагоприятным факторам внешней среды. Действующим веществом препарата является фитогормон 24-эпибрассинолид. В течение короткого времени ЭПИН получил применение на многих сельскохозяйственных культурах и в настоящее время широко известен в странах СНГ. Отличительной особенностью препарата являются то, что благодаря низким нормам расхода действующего вещества (5-50 мг/га) потребность в нем будет составлять при самом широком применении в масштабе РБ лишь десятки килограммов, в отличие от многотоннажного потребления традиционных средств защиты и повышения урожайности растений. Следующим этапом развития данного направления является использование брассинолида, наиболее биологически активного brassinosterоида, в качестве действующего вещества.

Однако определенным недостатком brassinosterоидов является их сравнительно короткий срок действия - растения имеют достаточно эффективный механизм дезактивации экзогенных гормонов. Поэтому изучение особенностей биотрансформаций brassinosterоидов у важнейших сельскохозяйственных культур имеет принципиальное значение для повышения эффективности применения brassinosterоидов в сельском хозяйстве. Кроме того, данные о биосинтетических превращениях brassinosterоидов могут быть использованы для создания препаратов с желаемым спектром действия.

**Связь работы с крупными научными программами, темами.** Работа является частью плановых исследований Лаборатории химии стероидов ИБОХ НАН Беларуси, выполненных в соответствии с заданиями Государственных программ фундаментальных исследований “Биооргсинтез” по теме “Разработка методов синтеза и структурной модификации природных стероидов, их аналогов и других биоактивных веществ с целью получения новых соединений с комплексом ценных свойств для сельского хозяйства и медицины” (1996-2000) и “Биооргсинтез-2” по теме “Разработка рациональных подходов к целенаправленному синтезу стероидов и родственных биорегуляторов с целью получения новых эффективных препаратов для сельского хозяйства и медицины”

(2001-2005), Государственной программы прикладных научных исследований “Биоанализ и диагностика” по теме “Разработать высокочувствительную систему иммуно-ферментного анализа фитогормонов” (2003-2005), научных грантов Фонда фундаментальных исследований Республики Беларусь по теме “С-Функционализация природных brassinosterоидов: подход к синтезу новых типов биоактивных соединений, гаптенон и конъюгатов” (1998-2000), “Синтез и биосинтез brassinosterоидов” (2002-2004), и проекта ИНТАС “Total and semi synthesis of bioactive terpenoids and steroids” (1996-2000).

**Цель и задачи исследования.** Задачей настоящей работы являлась разработка масштабируемых методов получения труднодоступных природных brassinosterоидов и их биопредшественников на основе доступного стероидного сырья; разработка методов синтеза новых изотопномеченных brassinosterоидов; разработка методов выделения и анализа brassinosterоидсодержащих фракций растительного материала; исследование биотрансформаций brassinosterоидов в *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*.

**Объект и предмет исследования.** Объектами химической части настоящего исследования являлись brassinosterоиды и их биосинтетические предшественники, а также их дейтерированные аналоги, для которых характерен С-28 скелет, содержащий 24 $\alpha$ -метильную группу. Предметом изучения являлась разработка методов синтеза указанных соединений. Объектом для изучения биосинтеза brassinosterоидов являлись растения: *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*. Разработка методов выделения и анализа brassinosterоидсодержащих фракций растительного материала являлась предметом исследования.

**Гипотеза.** Различие в brassinosterоидном составе различных видов и даже сортов растений и в их физиологической реакции на экзогенные brassinosterоиды указывает на существование структурной видоспецифичности биорегуляторного действия brassinosterоидов, для понимания сущности которого необходимо знание особенностей биосинтеза brassinosterоидов у различных растительных видов.

**Методология и методы проведенного исследования.** Методологическую основу исследования составляла совокупность методов современной органической химии и физико-химических методов анализа. При исследовании биосинтеза brassinosterоидов были использованы стандартные и оригинальные методы выращивания и обработки растительных культур, экстракционного и хроматографического выделения brassinosterоидсодержащих фракций растительного материала и их последующего анализа.

**Научная новизна полученных результатов:**

- Разработаны новые методы синтеза стероидных С<sup>22</sup>-альдегидов с использованием в качестве исходных соединений производных 23,24-

биснорхоленовой кислоты, что позволило получить ключевые продукты химического синтеза brassинолида и его аналогов без применения малотехнологичной стадии озонлиза  $\Delta^{22}$ -стероидов.

- Осуществлен синтез 15 дейтерированных аналогов brassиностероидов. Отличительной особенностью метода является построение боковой цепи путем конденсации низкомолекулярного фрагмента, содержащего шесть атомов дейтерия и сформированный асимметрический атом углерода, с должным образом функционализированными  $C^{22}$ -альдегидами.
- Разработан новый эффективный метод выделения brassиностероидсодержащей фракции растительного материала и новый эффективный метод (ВЭЖХ-МС) анализа brassиностероидов, который на два порядка чувствительнее любого из известных ранее методов анализа.
- Впервые изучен биосинтез 3-эпибрассинолида и исследована обратимая конверсия между  $3\alpha$ - и  $3\beta$ -brассиностероидами в *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*.
- Впервые в растительных источниках (*Secale cereale*) обнаружены два новых brassиностероида – 2,3-диэписекастерон и секастерол.
- Обнаружен новый путь биосинтеза brassинолида через эпоксиbrассиностероиды, который реализуется в *Secale cereale*.

#### **Практическая и экономическая значимость полученных результатов.**

Разработанные методы масштабируемого синтеза brassиностероидов, а в частности наиболее биологически активного из них – brassинолида, могут являться основой при создании препаратов нового поколения для сельского хозяйства. Полученные знания о путях биосинтеза brassиностероидов в растениях могут быть использованы при разработке новых препаратов избирательного действия.

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

- Метод синтеза  $C^{22}$ -альдегидов из производных 23,24-биснорхоленовой кислоты, позволяющий отказаться от трудоемкой и трудномасштабируемой стадии озонлиза  $\Delta^{22}$ -олефинов, которая являлась одним из препятствий на пути разработки препаративного синтеза brassинолида.
- Усовершенствованный метод получения хирального синтона боковой цепи 24 $\alpha$ -метилbrассиностероидов – (2*S*)-2,3-диметилбутилфенил сульфона, из (2*R*)-3-гидрокси-2-метилпропионата.
- Синтез 15 дейтерированных аналогов brassиностероидов, содержащих три или шесть атомов дейтерия в положениях не подверженных изотопному обмену. Полученные соединения являются ценным инструментом для изучения тонких особенностей биосинтеза brassиностероидов в растениях.
- Разработка нового эффективного метода выделения brassиностероидсодержащей фракции растительного материала и нового



эффективного метода (ВЭЖХ-МС) анализа брассиностероидов, который на два порядка чувствительнее любого из ранее известных методов анализа.

- Данные по биосинтезу 3-эпибрассинолида в *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* и *Secale cereale* и обнаружение обратимой конверсии между 3 $\alpha$ - и 3 $\beta$ -брассиностероидами в этих культурах.
- Обнаружение двух новых брассиностероидов – 2,3-диэписекастерона и секастерола в *Secale cereale*, а также открытие нового пути биосинтеза брассинолида в данном растении.

**Личный вклад соискателя** состоит в проведении экспериментальной работы, в осуществлении поиска путей достижения цели, в интерпретации результатов. Постановка задач, решение методологических проблем, подготовка материалов для научных публикаций осуществлялись совместно с чл.-корр. НАН Беларуси, проф., д.х.н. В.А. Хрипачом, д.х.н. В.Н. Жабинским и доктором Б. Шнайдером. Работа по исследованию биосинтеза брассиностероидов выполнялась под руководством доктора Б. Шнайдера в Институте химической экологии имени М. Планка (г. Йена, Германия).

**Апробация основных результатов работы.** Основные результаты диссертации представлены на XIX и XX конференциях по изопреноидам (Гданьск – Юрата, 2001; Либерец 2003), Молодежной научной школе-конференции “Актуальные проблемы органической химии” (Новосибирск, 2001), 9-ой конференции Международного изотопного общества (Бад-Соден, 2001), Симпозиуме молодых ученых (Гаргьяно, 2002), 4-ом Всероссийском симпозиуме по органической химии (Москва – Углич, 2003), Международной конференции “Химия, структура и функции биомолекул” (Минск, 2004).

Отдельные этапы данного исследования вошли составной частью в цикл работ “Исследование биосинтеза брассиностероидов”, отмеченной премией для молодых ученых НАН Беларуси (2003 г.)

**Опубликованность результатов.** Изложенные в диссертации результаты составили предмет 7 статей в международных научных изданиях и 9 тезисов докладов, всего 66 стр.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения; обзора литературы по теме диссертации; обсуждения результатов исследований, экспериментальной части, заключения и списка использованных литературных источников (294 источника). Работа изложена на 143 стр., содержит 13 таблиц, 49 схем и 21 рисунок.

# 1. БИОСИНТЕЗ СТЕРОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ

Стероиды являются важным классом природных продуктов и обладают широким спектром биологической активности [1-5]. Хотя, по-видимому, они присущи всем организмам, более 80% животных не способны осуществить полный путь биосинтеза стероидных соединений [6]. Несмотря на то, что организм человека синтезирует холестерин, его количества недостаточно для нормального функционирования. Поэтому для животных и человека является физиологически важным потребление экзогенных стероидов [3, 5].

С биосинтетической точки зрения, стероиды являются представителями большого класса природных соединений – терпенов (изопреноидов) (Рисунок 1.1). Стероиды растений представлены множеством подклассов и могут быть разделены на группы по биологической значимости [7]:

- соединения, которые обладают физиологической ролью гормонов в растениях (брасиностероиды);
- соединения, родственные гормонам человека и животных (экдистероиды, прогестагены, кортикостероиды, кальциферолы);
- специфические растительные стероиды, выполняющие защитную роль (буфадиенолиды, карденолиды, сапогенины, алкалоиды, витанолиды, кукурбитацены).

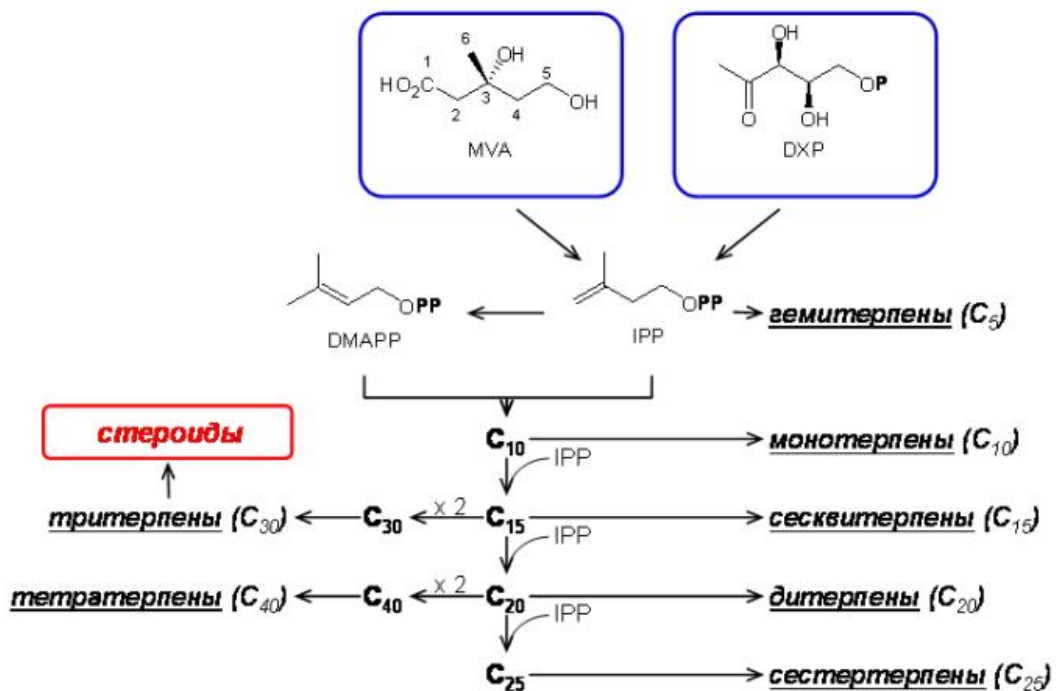


Рисунок 1.1 Биосинтез изопреноидов.

Настоящий обзор охватывает достижения за последние годы и отличается от подобных обзоров тем, что в нем рассмотрены различные классы стероидных соединений, а изученные отдельные биотрансформации стероидов рассмотрены неразрывно с общей схемой биосинтеза их.

### 1.1. Биосинтез сквалена

Биосинтетическим предшественником стероидов является сквален – первый представитель тритерпенов. Биосинтез сквалена основан на последовательном присоединении IPP к DMAPP (Рисунок 1.1). IPP и DMAPP являются структурными единицами терпенов и могут получены двумя путями [8-15]:

- через мевалоновую кислоту – продукт метаболизма ацетата (мевалонатный путь),
- через 1-дезоксид-D-ксилозу-5-фосфат (мевалонат-независимый путь).

В течение многих лет считалось, что биосинтез природных терпенов основан на мевалонатном пути. Однако в результате доскональных исследований недавно был открыт новый путь биосинтеза, который, возможно, является более распространенным в природе [14, 16-18].

#### 1.1.1. Биосинтез диметилаллилпирофосфата через мевалоновую кислоту

Для синтеза мевалоновой кислоты необходимы три молекулы ацетил-СоА. Вначале взаимодействие двух молекул по Кляйзену приводит к ацетоацетил-СоА **1** (Схема 1.1). Данная реакция протекает при участии ацетоацетил-СоА тиолазы (EC 2.3.1.9), которая кодируется геном ERG10 [19, 20]. Третья молекула вводится через стереоспецифическое альдольное присоединение катализируемое гидроксиметилглутароил-СоА синтазой (EC 4.1.3.5) с образованием гидроксиметилглутароил-СоА **2** [20, 21]. Трансформация **2** в мевалоновую кислоту **3** включает ступенчатое восстановление тиоэфира до первичного спирта при участии гидроксиметилглутароил-СоА редуктазы (EC 1.1.1.34) [20, 22, 23].

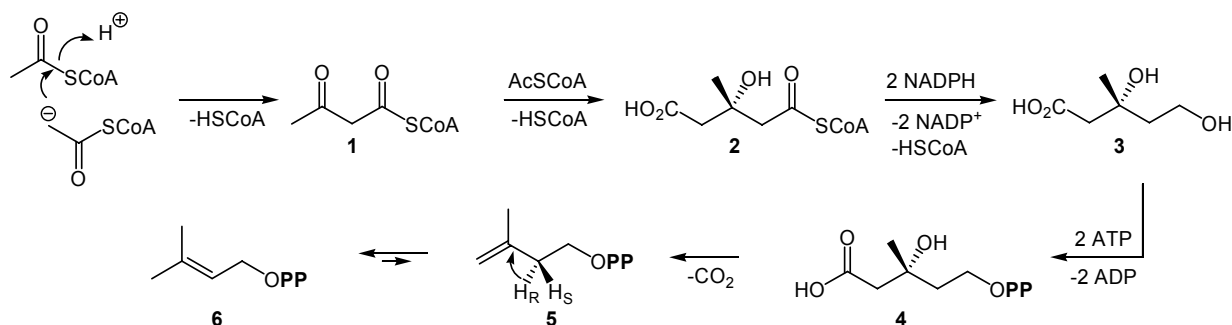


Схема 1.1

Полученная мевалоновая кислота **3**, содержащая 6 атомов углерода, подвергается дифосфорилированию с образованием пирофосфата **4**. В данный процесс вовлечена мевалонат киназа (EC 2.7.1.36) и фосфомевалонат киназа (EC 2.7.4.2), которые кодируются ERG12 и ERG8 генами, соответственно [20, 24].

Последующее фосфорилирование третичной спиртовой группы (мевалонат пирофосфат декарбоксилаза (EC 4.1.1.33)) приводит к образованию IPP **5**, содержащему 5 атомов углерода [25]. Трансформация IPP **5** в DMAPP **6** протекает под действием стереоспецифичной изомеразы (EC 5.3.3.2), удаляющей *pro-R* протон [26].

### 1.1.2. Биосинтез диметилаллилпирофосфата через 1-дезоксид-Д-ксилозу-5-фосфат

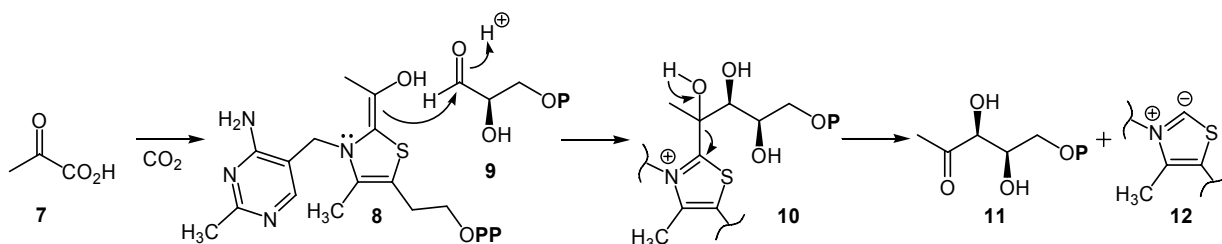


Схема 1.2

Взаимодействие пирувиноградной кислоты **7** с тиамин пирофосфатом приводит к енамину **8** (Схема 1.2). В результате последующей нуклеофильной атаки енамина **8** на D-глицераль 3-фосфат **9** образуется продукт **10**. Элиминирование тиаминпирофосфата приводит к 1-дезоксид-Д-ксилозу-5-фосфату **11** [15, 27]. Описанный процесс возможен при участии дезоксиксилулоза-фосфат синтазы (EC 4.1.3.37) [28].

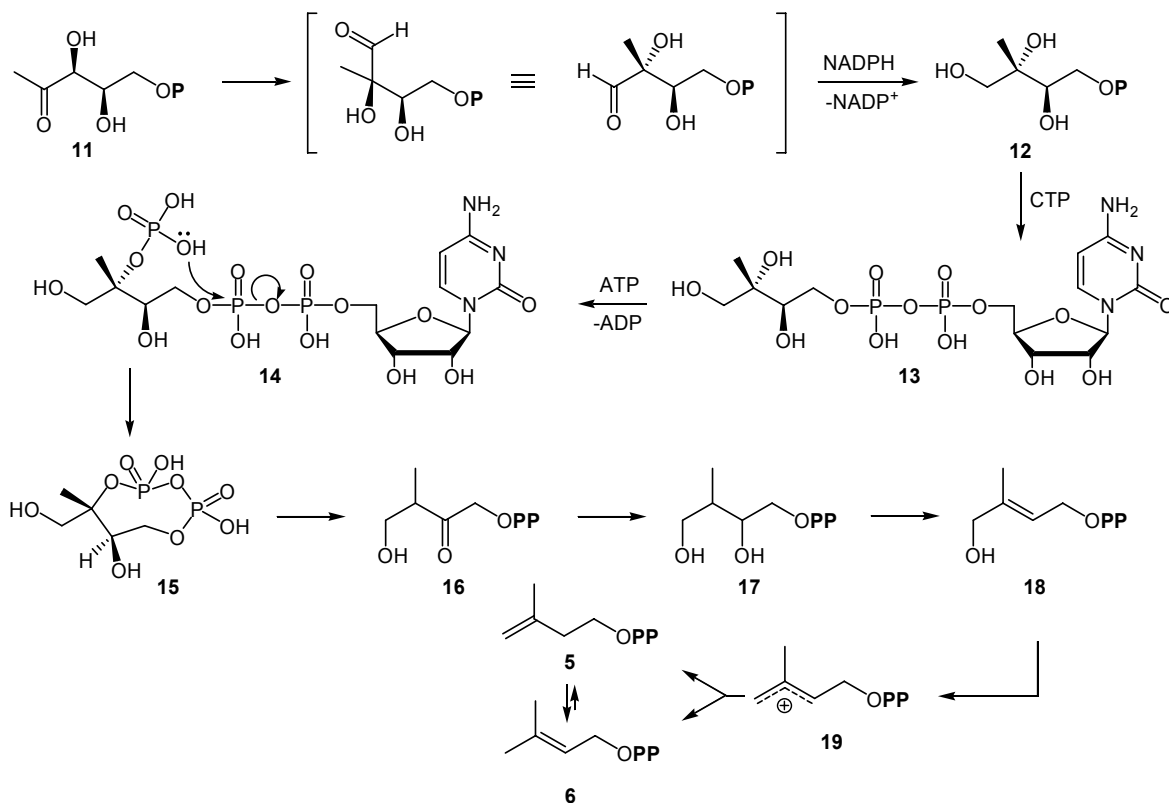


Схема 1.3

Пинаколиновая перегруппировка 1-дезоксид-D-ксилозулоза-5-фосфата **11** и последующее восстановление приводит к 2-С-метил-D-эритритол-4-фосфату **12** (Схема 1.3). Перегруппировка и последующее восстановление катализируется одним ферментом – дезоксиксилулоза-фосфат редуктоизомеразой (ЕС 1.1.1.267), а альдегид, продукт перегруппировки, невозможно обнаружить [28, 29]. Реакция 2-С-метил-D-эритритол 4-фосфата **12** с цитидин трифосфатом (СТР) приводит к образованию производного **13**, фосфорилирование которого приводит к 2-фосфату **14**. В описанные превращения вовлечены два фермента (ЕС 2.7.7.60, ЕС 2.7.1.148) [30, 31]. Дальнейшая трансформация 2-фосфата **14** заключается в образовании циклопирофосфата **15**, катализируемом синтазой (ЕС 4.6.1.12) [20, 32]. Дальнейшая трансформация циклопирофосфата **15** в IPP **5** досконально не изучена. Предполагается превращение циклопирофосфата **15** в пирофосфат **18** через интермедиаты **16** и **17**. (E)-4-гидрокси-3-метилбут-2-енил пирофосфат **18** является биосинтетическим предшественником IPP **5** и DMAPP **6** [33].

Мевалонатный путь и мевалонат-независимый путь являются источниками структурных блоков изопреноидов для биосинтеза терпенов, что подтверждено экспериментальными данными. В организмах животных и грибов имеет место исключительно мевалонатный путь, в то время как в водорослях, бактериях и простейших одноклеточных организмах могут осуществляться оба пути биосинтеза, либо исключительно один. В высших растениях осуществляются оба пути биосинтеза, однако ферменты мевалонатного пути локализованы в цитозоле, а ферменты мевалонат-независимого пути найдены в хлоропластах. При этом было показано, что тритерпены и, в частности, стероиды, которые обнаружены в цитозоле растительных клеток, образуются по мевалонат-независимому пути [13, 18, 34].

### ***1.1.3. Биосинтез сквалена***

Первоначально биосинтез сквалена основан на последовательном присоединении IPP **5** к DMAPP **6** с образованием фарнезилпирофосфата (FPP). На первом этапе, взаимодействие DMAPP **6** и IPP **5**, контролируемое пренилтрансферазой (фарнезил-фосфат синтаза (FPS) (ЕС 2.5.1.1)) приводит к геранилпирофосфату **22** (Схема 1.4). Считается, что первоначальным этапом является ионизация DMAPP **6** приводящая к катиону **20**, к которому присоединяется молекула IPP **5** с образованием катиона **21**. Последующее элиминирование протона является стереоконтролируемым, аналогично изомеризации IPP **5** в DMAPP **6**, и приводит к образованию транс-двойной связи. Геранилпирофосфат **22** является предшественником монотерпенов, а последующее присоединение к нему молекулы IPP **5** приводит к фарнезилпирофосфату (FPP) **23**, которое протекает аналогично взаимодействию DMAPP **6** и IPP **5** [11, 35, 36]. кДНК, кодирующая FPS1 (*Arabidopsis*), выделена. Кодируемый кДНК полипептид

содержит 343 аминокислотных остатка и идентичен примерно на 50% фарнезилпирофосфат синтазам человека, крыс и дрожжей. Вторая кДНК, соответствующая FPS2, кодирует белок, содержащий 343 аминокислотных остатка. FPS1 и FPS2 идентичны на 90.6% [37-39]. Фарнезилпирофосфат **23** является предшественником геранилгеранилпирофосфата **24** и геранилфарнезилпирофосфата **25**, которые вовлечены в синтез дитерпенов, сестертерпенов и тетратерпенов [40-42].

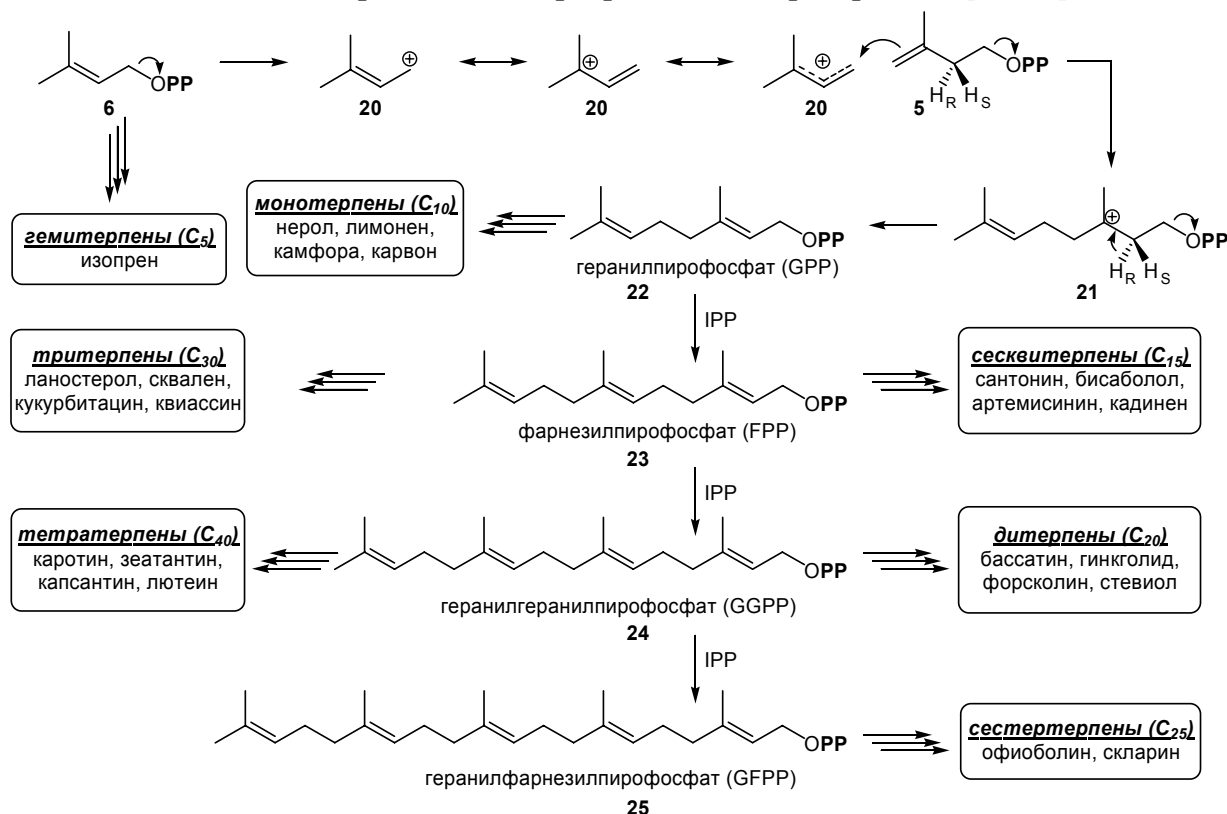


Схема 1.4

Отличительной особенностью тритерпенов является то, что они не образуются в результате формального роста цепи путем присоединения IPP **5**. Вместо этого, две молекулы FPP **23** соединяются (хвост к хвосту) с образованием первого представителя тритерпенов – сквалена. Одна молекула FPP **23** необходима для образования аллильного катиона **26**, к которому присоединяется вторая молекула с образованием третичного катиона **27** (Схема 1.5). Последующий отрыв протона и замыкание циклопропанового кольца приводит к образованию ключевого циклического интермедиата – пирофосфата пресквалена **28** [43, 44]. Очевидно, для образования сквалена необходимо соединение между C<sub>1</sub>-атомами молекул FPP **25**, а в пирофосфате пресквалена **28** присутствует связь между атомом C<sub>1</sub> одной молекулы и C<sub>2</sub> другой. Вследствие вышесказанного предложен механизм, описывающий изменение связи между двумя молекулами FPP. Элиминирование пирофосфатной группы от пирофосфата пресквалена **28** приводит к образованию невыгодного катиона **29**, который в результате перегруппировки Вагнера-Меервейна превращается в более стабильный третичный катион **30**. Последующий

разрыв  $C_1-C_2'$  связи приводит к образованию аллильного катиона **31**, восстановление которого NADPH приводит к образованию целевого сквалена **32** [44].

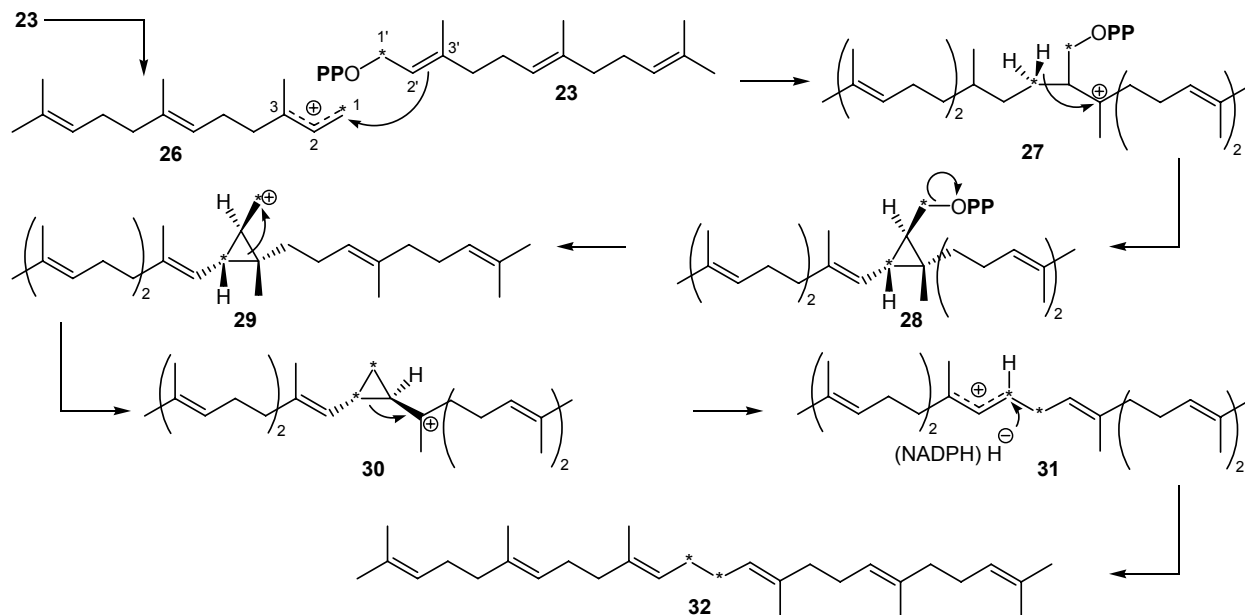


Схема 1.5

Конденсация двух молекул FPP, приводящая к образованию сквалена, катализируется сквален синтазой (EC 2.5.1.21) в присутствии NADPH и  $Mg^{2+}$  [45]. Две перекрывающихся кДНК клона *Arabidopsis thaliana* сквален синтазы были выделены и охарактеризованы [46]. Они кодируют белок, содержащий 410 аминокислотных остатков, который более чем на 40% идентичен сквален синтазам млекопитающих и дрожжей.

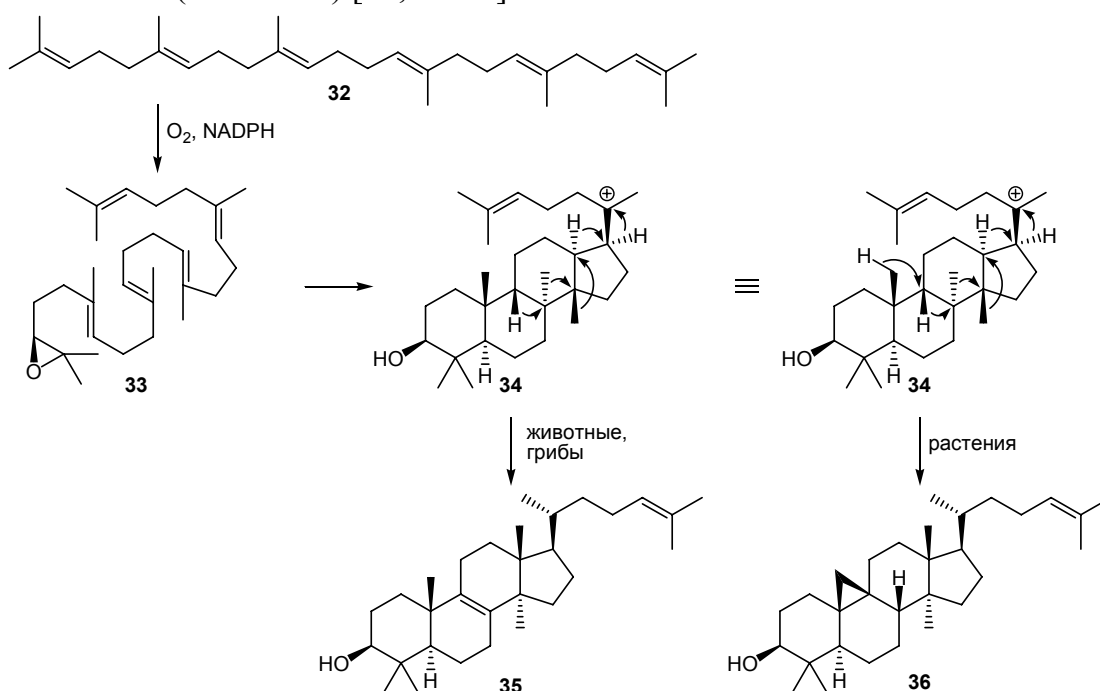
## 1.2. Циклизация сквалена

Сквален является ключевым соединением в биосинтезе тритерпенов. Возможны различные варианты циклизации сквалена, приводящие к различным продуктам, которые определяются конформацией 2,3-эпоксисквалена в переходном состоянии и специфичностью синтазы, ответственной за процесс циклизации [47, 48].

### 1.2.1. Биосинтез ланостерина и циклоартенола

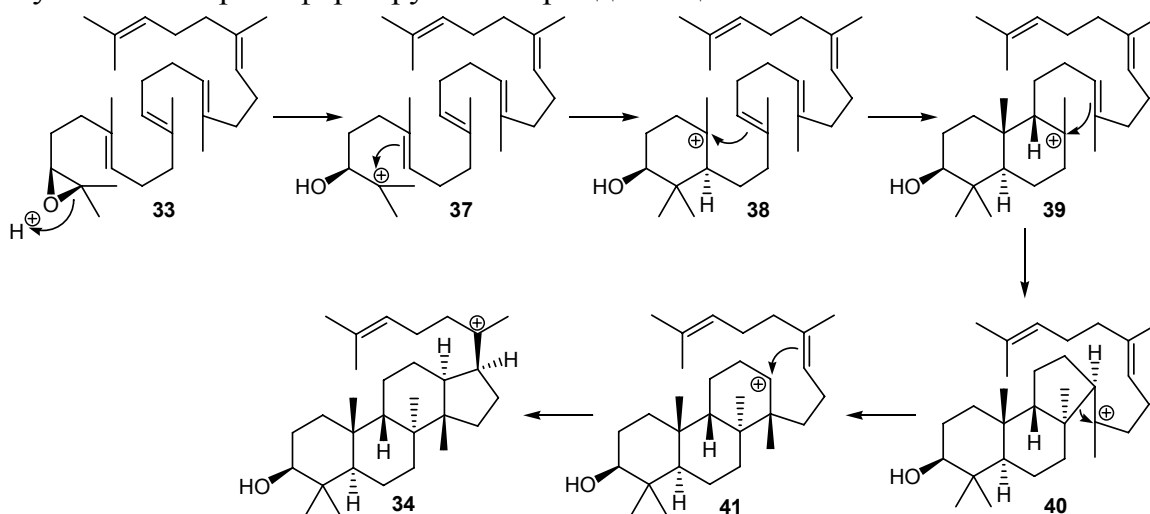
Циклизация сквалена проходит через 2,3(*S*)-эпоксид сквалена **33**, получаемый в реакции, контролируемой сквален эпоксидазой (EC 1.14.99.7) и требующей присутствия кислорода и NADPH. Циклизация происходит на поверхности фермента, который определяет складчатую локализацию длинной цепи 2,3-эпоксида **33**. Циклизация происходит скачкообразно и, как правило, сопровождается перегруппировками, которые определяются специфичностью фермента. Протостерил - катион **34**, являющийся продуктом циклизации 2,3-эпоксида **33**, подвергается различным перегруппировкам под действием синтаз

животных и растений, превращаясь в ланостерин **35** и циклоартенол **36**, соответственно (Схема 1.6) [11, 49-52].



*Схема 1.6*

Протонирование 2,3-эпоксида сквалена **33** приводит к образованию энергетически выгодного третичного катиона **37**, который удобно расположен для последующего электрофильного присоединения с образованием 6-членного цикла и нового третичного катиона **38** (Схема 1.7). Электрофильное присоединение следующей двойной связи приводит к катиону **40** с образованием 5-членного цикла. Последующий 1,2-алкильный сдвиг Вагнера-Меервейна приводит к формированию стероидного цикла С с образованием катиона **41**. Заключительным этапом биосинтеза протостерилового катиона **34** является электрофильное присоединение, в результате которого формируется стероидный цикл D.



*Схема 1.7*



Стереохимия протостерилового катиона контролируется типом “складывания” 2,3-эпоксида сквалена **33** и, возможно, лимитирует процесс циклизации. “Складывание” цепи 2,3-эпоксида сквалена **33** аппроксимировано к конформации кресло-ванна-кресло-ванна (Схема 1.8), и характеристики данной пространственной ориентации определяют синтез целевого соединения [49, 53].

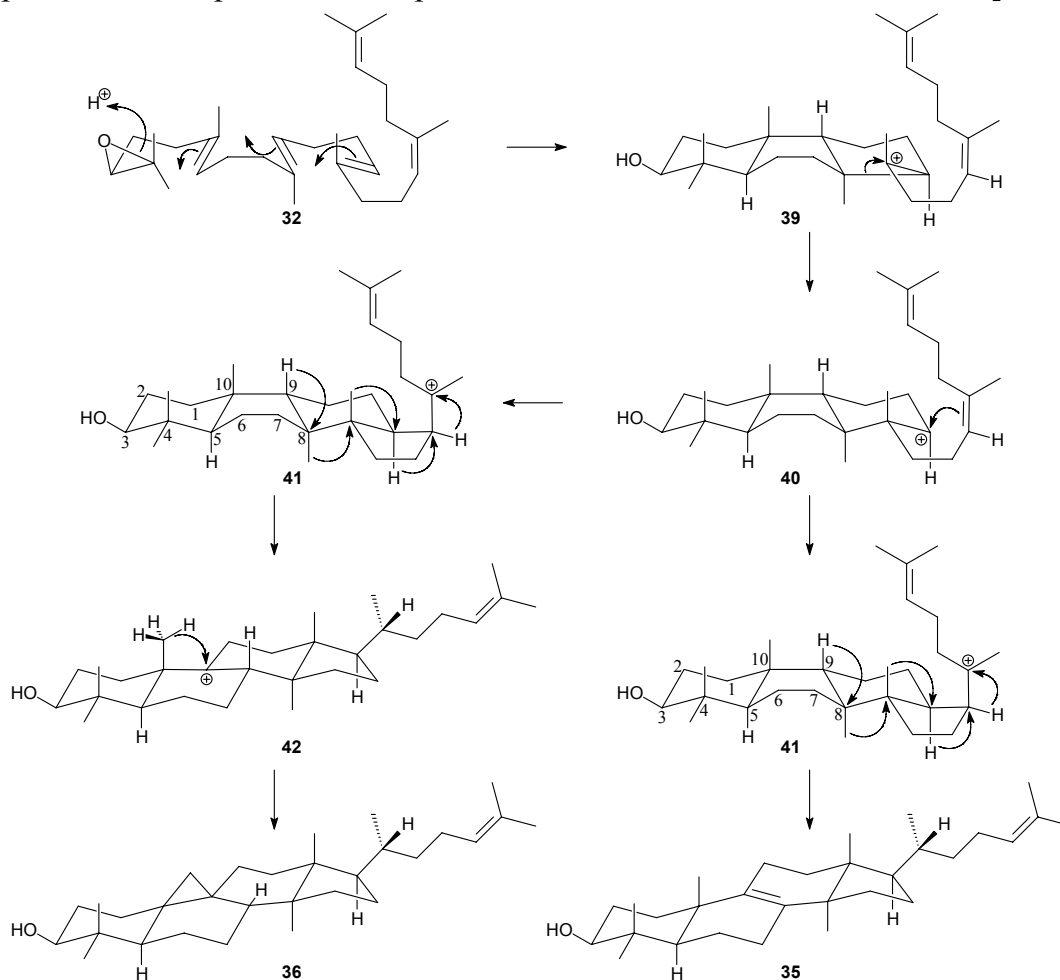


Схема 1.8

В случае биосинтеза ланостерина **35** протостерильный катион **41** претерпевает серию 1,2-сдвигов (Схема 1.8). Первоначально, миграция гидрид-иона при  $C_{17}$  приводит к образованию нового катиона и вызывает последующие миграции гидрид-иона, а затем метила и так далее до тех пор, пока протон не будет потерян и будет сформирована двойная связь ланостерина **35**. Данная трансформация протостерилового катиона **41** показывает направление предпочтительной последовательности реакций. Особенно интересен тот факт, что мигрирующая группа находится в *анти*-положении к входящей. При отсутствии *анти*-группы для протона при  $C_9$  последовательность сдвигов обрывается с образованием двойной связи. В случае циклоартенола **36**, содержащего циклопропановый цикл, протон при  $C_9$  мигрирует к  $C_8$ , а последовательность сдвигов обрывается образованием цикла и потерей одного протона метильной группы [11, 54, 55]. Процесс образования циклоартенола в высших растениях

катализируется циклоартенол синтазой (EC 5.4.99.8). При формировании циклического скелета стероидов происходит разрыв 11 связей и образование 11 новых. Ген CAS1 (*Arabidopsis thaliana*) был клонирован и охарактеризован [54]. кДНК, кодирующая циклоартенол синтазу, оказалась гомологичной ланостерол синтазе, выделенной из *Candida albicans*, и сквален-гопан циклазе, выделенной из *Bacillus acidocalcarius*.

### 1.2.2. Биосинтез кукурбитацинов

Возможные трансформации протостерилового катиона **34** не ограничиваются формированием ланостерина **35** или циклоартенола **36**. В C<sub>9</sub>-катионе **42** (интермедиат биосинтеза циклоартенола **36**) метильная группа при C<sub>10</sub> находится в *анти*-положении к протону при C<sub>5</sub> и может быть вовлечена в продолжение последовательности сдвигов. Данные трансформации закачиваются образованием соединения **43**, которое является биопредшественником токсичных природных тритерпенов – кукурбитацинов. Общее представление о структуре данных соединений может дать кукурбитацин С **44**, выделенный из проростков *Cucumis sativus* [56, 57]. Биосинтез кукурбитацинов окончательно не изучен и нуждается в дополнительных исследованиях.

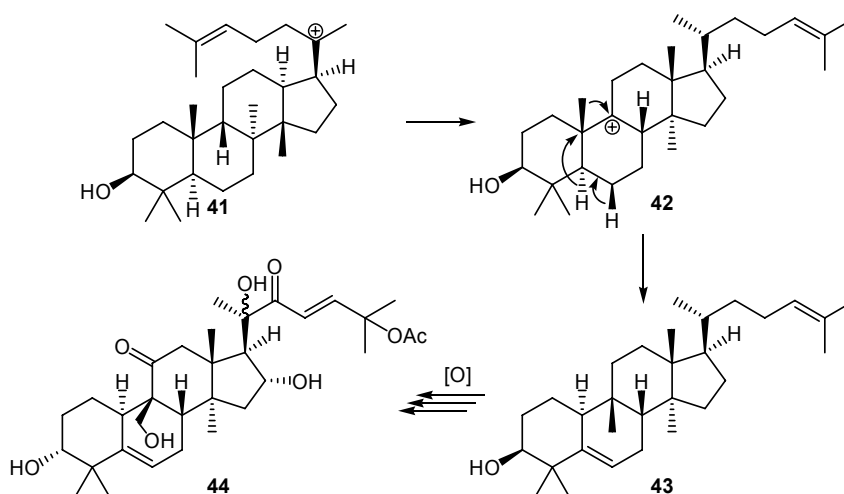


Схема 1.9

### 1.2.3. Биосинтез эуфола

Конформация 2,3-эпоксида сквалена **33** в виде кресло-ванна-кресло-ванна является наиболее распространенной в растениях, однако возможно складывание на поверхности фермента в виде кресло-кресло-кресло-ванна (Схема 1.10). В результате циклизации данная конформация приводит к образованию даммаренил-катиона **45**, который отличается от протостерилового катиона **34** конфигурацией оптических центров при C<sub>8</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub> и C<sub>17</sub>. В результате последовательности 1,2-сдвигов даммаренил катион **45** трансформируется в эуфол **46**, стереоизомер ланостерина **35** выделяемый из *Euphorbia* (молочай, семейство – *Euphorbiaceae*) [58-61].

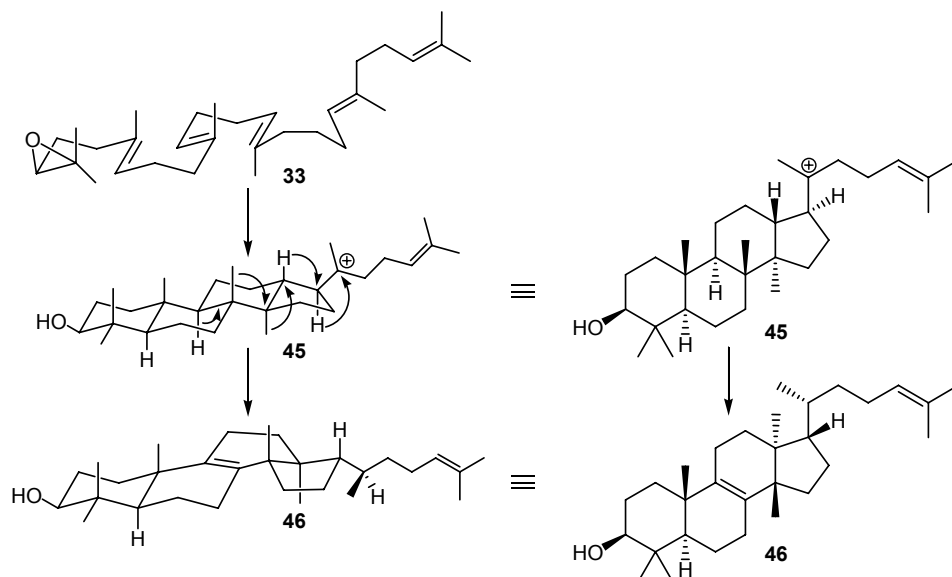


Схема 1.10

#### 1.2.4. Биосинтез других тритерпенов

Если даммаренил-катион **45** не подвергается перегруппировке Вагнера-Меервейна с потерей протона, он может взаимодействовать с водой с образованием изомерных спиртов **47** (Схема 1.11). Однако, может иметь место альтернативный 1,2-сдвиг с образованием катиона **48**, который в результате последующего электрофильного присоединения двойной связи превращается в катион **49**. Потеря протона катионом **49** приводит к люпеолу **50** найденному, в люпине (*Lupinus luteus*). Альтернативой является биосинтез таракастерина **52**, протекающий через катион **51** [11, 62-64].

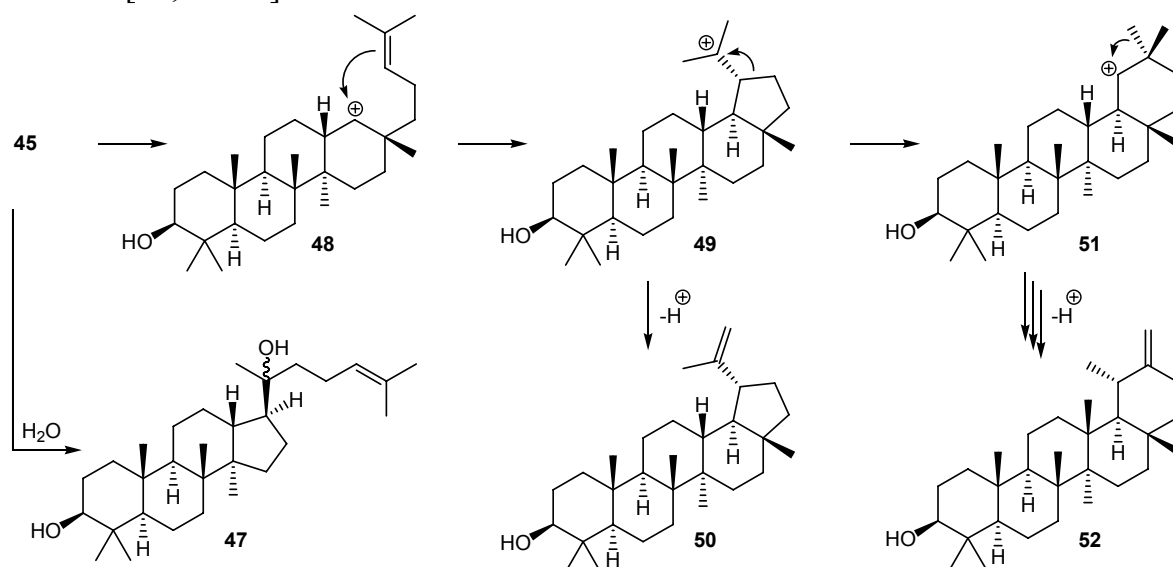


Схема 1.11

Интересной является циклизация сквалена, а не его 2,3-эпоксида, с образованием гопаноидов (Схема 1.12) [65].

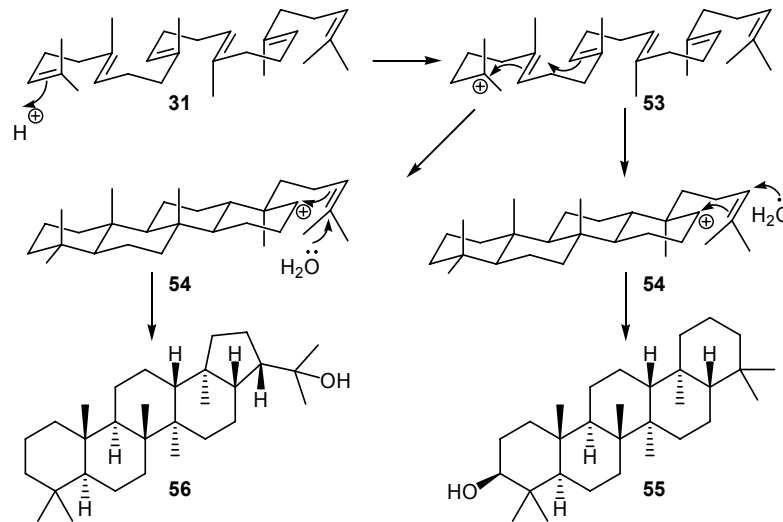


Схема 1.12

### 1.3. Модификация продуктов циклизации 2,3-эпоксисквалена

Продукты циклизации 2,3-эпоксисквалена **33** подвергаются дальнейшим модификациям в растениях, заключающимся в комбинации биотрансформаций: алкилирования, окисления и возможной последующей деградации тритерпенового скелета.

#### 1.3.1. Биосинтез лимоноидов и кваисиноидов

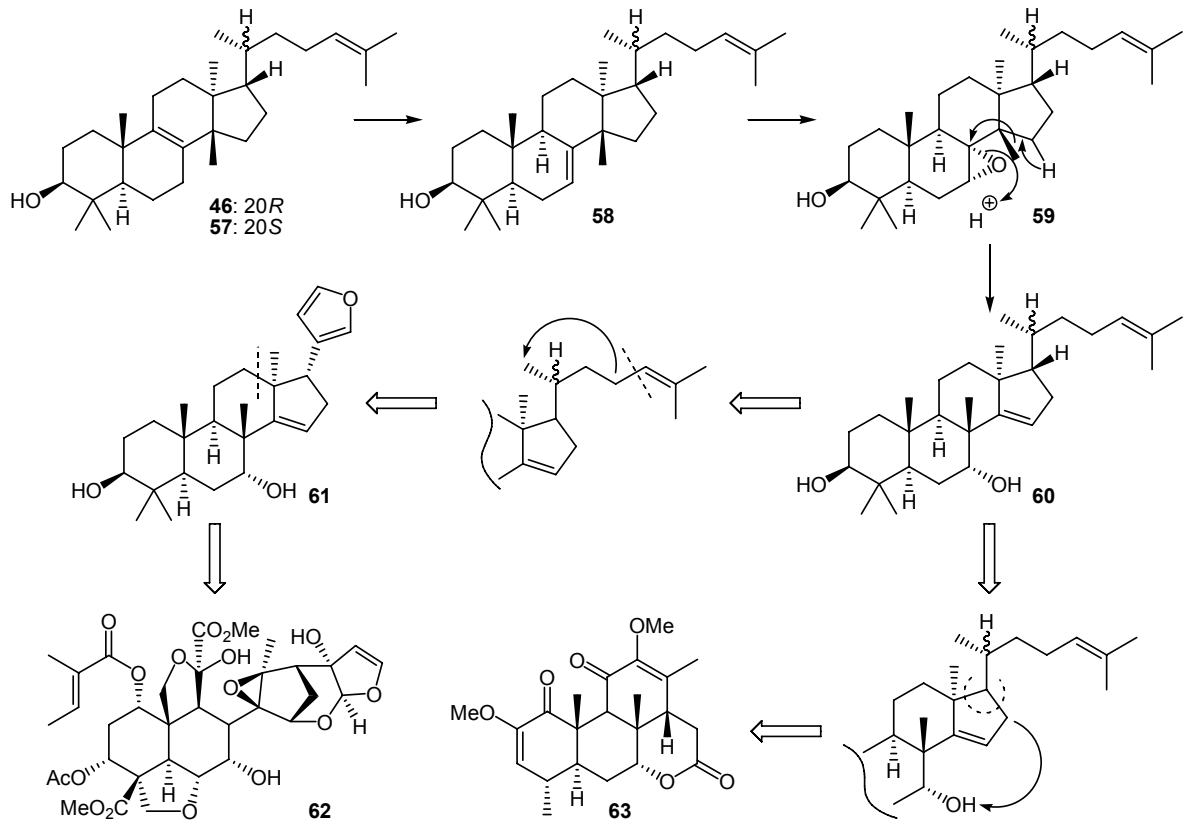


Схема 1.13

Аллильная изомеризация эуфола **46** и его  $C_{20}$ -стереоизомера **57** приводит к  $\Delta^7$ -стероидам **58** (Схема 1.13). Окисление последних до эпоксидов **59** и последующая перегруппировка приводит к спиртам **60**. Стероидные спирты **60** являются предшественниками модифицированных стероидов лимонидов и кваассиноидов. Биосинтез данных классов соединений детально не изучен. Предполагается потеря четырехуглеродного фрагмента боковой цепи стероидных спиртов **60** с последующим образованием фуранового цикла, характерного для большинства лимонидов **61**. Для лимонидов также являются характерными трансформированная циклическая часть [66-68]. Азадирахтин **62**, возможно, является одним из наиболее модифицированных лимонидов [69]. Биосинтез кваассиноидов предполагает потерю 10 атомов углерода, включая заместитель при  $C_4$ , и последующую модификацию циклической части. Кваассин **63** является представителем кваассиноидов. Лимониды и кваассиноиды являются типичными растительными метаболитами и широко распространены [58-61].

### 1.3.2. Биосинтез фитостеринов

Среди стероидов растений наиболее распространенными являются фитостерины (Рисунок 1.2). Первым представителем фитостеринов является циклоартенол **36** = **64A**, продукт циклизации 2,3-эпоксида сквалена **33**. Наиболее распространенными фитостеринами являются: ситостерин **77I**, кампестерин **77G**, стигмастерин **77R** (Таблица 1.1).

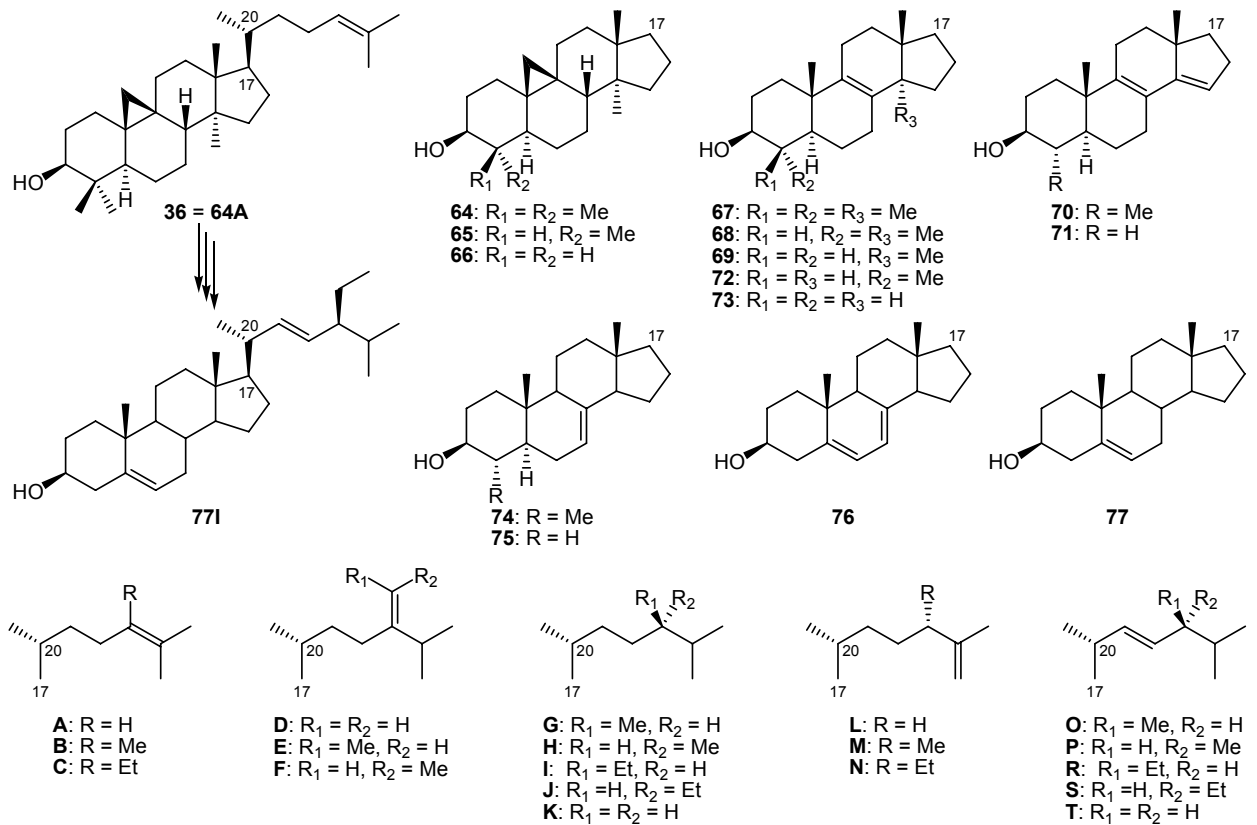


Рисунок 1.2 Структурное разнообразие фитостеринов.

Биосинтез фитостеринов включает различные комбинации модификаций циклоартенола **64A** (Рисунок 1.3):

- раскрытие циклопропанового кольца,
- аллильная изомеризация,
- алкилирование,
- деметилирование,
- восстановление двойной связи
- дегидрирование.

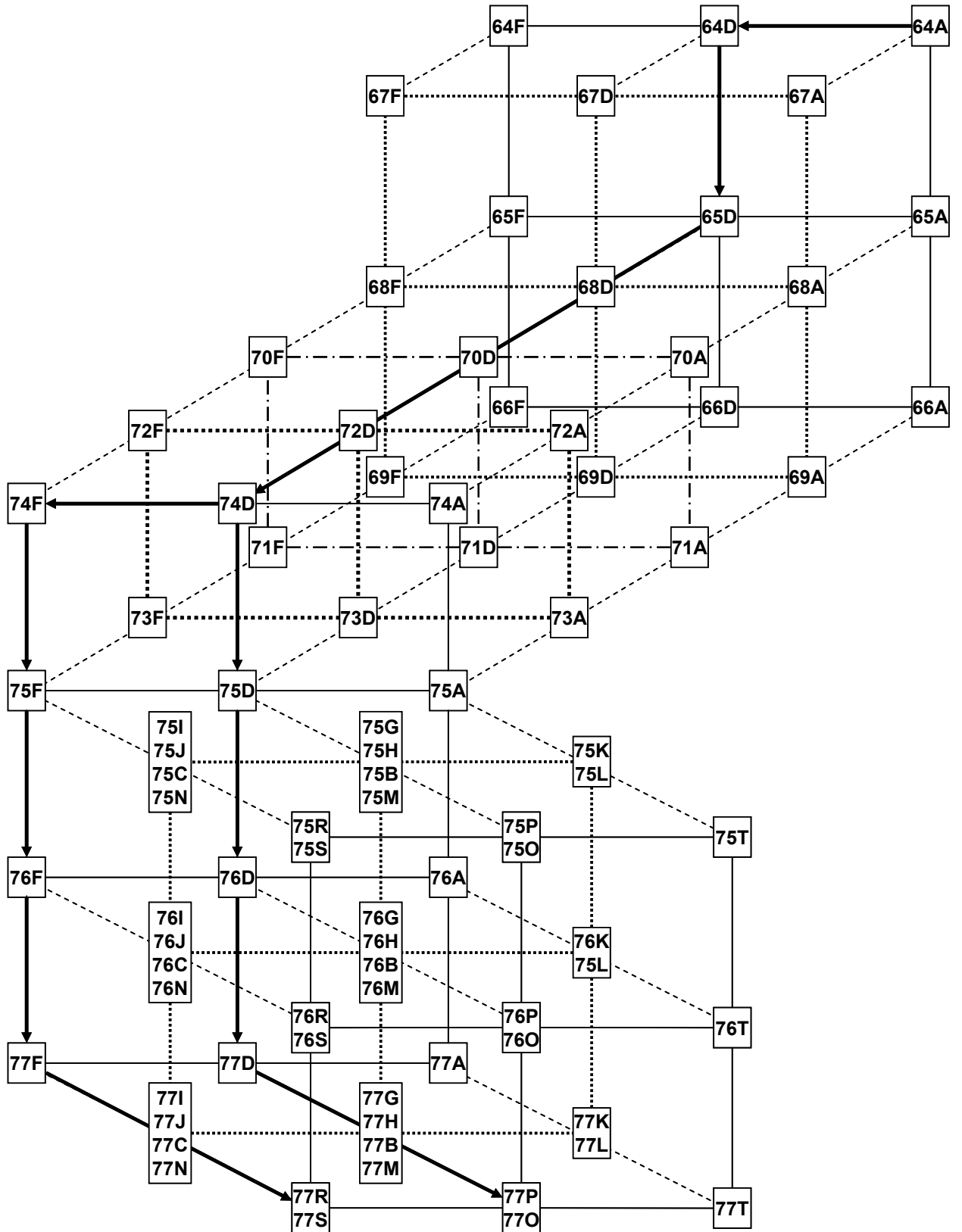
Фитостерины имеют важное физиологическое значение. Во-первых, они являются компонентами клеточных мембран. Во-вторых, они участвуют в образовании двухслойных мембран и влияют на их развитие и проницаемость. В дополнение, они выполняют регуляторные и сигнальные функции в растениях. Кроме того, фитостерины – биопредшественники других растительных биоактивных стероидов: фитоэкдистероидов, brassinosterоидов, сапогенинов, стероидных алкалоидов, витанолидов, прогестинов, карденолидов, буфадиенолидов и витаминов D [1, 3, 6].

**Таблица 1.1**

***Распространенность фитостеринов (мг/кг свежего веса растения).***

<b>Культура</b>	<b>Σ стероидов</b>	<b>77I</b>	<b>77G</b>	<b>77R</b>	<b>77F</b>	<b>75F</b>	<b>Ссылка</b>
Рожь	910-1100	421	159	17	46	34	[3, 70]
Овес	329-520	167-282	24-40	12-15	22-31	24	[3, 70]
Ячмень	586-830	289	111	150	145	17	[3, 70]
Пшеница	603-690	309	88	15	23	14	[3, 70]
Брюссельская капуста	430	340	80	3.8	– <sup>1</sup>	– <sup>1</sup>	[71]
Брокколи	390	310	69	11	– <sup>1</sup>	– <sup>1</sup>	[71]
Цветная капуста	400	260	95	37	– <sup>1</sup>	– <sup>1</sup>	[71]
Морковь	160	110	22	28	– <sup>1</sup>	– <sup>1</sup>	[71]
Картофель	38	27	2.3	3.8	– <sup>1</sup>	– <sup>1</sup>	[71]
Яблоко	130	130	3.6	1.0	– <sup>1</sup>	– <sup>1</sup>	[71]
Апельсин	240	200	30	10	– <sup>1</sup>	– <sup>1</sup>	[71]

<sup>1</sup> Содержание не детектировалось.



*Рисунок 1.3 Предпочтительные направления биосинтеза фитостеринов (основные направления биосинтеза показаны жирными стрелками).*

### 1.3.2.1. Биосинтез ситостерина и стигмастерина

Биосинтез фитостеринов представляет собой различные комбинации последовательных реакций (Рисунок 1.3). Наиболее интересной является

трансформация циклоартенола **64A** в стигмастерин **77R**, отражающая основные закономерности биосинтеза фитостеринов (Схема 1.14).

Первым этапом биосинтеза стигмастерина **77R** является алкилирование циклоартенола **64A**. Данная трансформация катализируется S-аденозилметионин-стерол-С-метилтрансферазой (метилтрансферазой, SMT1). SMT1 контролирует уровень холестерина в растениях [72-79]. В серии последующих реакций продукт алкилирования 24-метиленициклоартенол **64D** подвергается деметилированию. Удаление метильной группы проходит стереоконтролируемо из  $\alpha$ -положения. Под действием 4 $\alpha$ -метилоксидазы метильная группа последовательно превращается в спирт **78**, альдегид **79** и затем в кислоту **80**. При протекании данной последовательности реакций расходуется NADPH и кислород, а также необходим цитохром b5. Кислота **80** под действием C<sub>4</sub>-декарбоксилазы трансформируется в циклозукаленон **81**, содержащий 3-кетогруппу. Третьим ферментом, задействованным в деметилировании, является 3-кеторедуктаза, селективно восстанавливающая кетогруппу в 3 $\beta$ -спирт **65D** [80-83]. Следующим специфическим этапом биосинтеза фитостеринов является трансформация циклопропанового фрагмента. Данное превращение катализируется изомеразой (EC 5.5.1.9), характерной для растительных объектов [84, 85]. Продукт изомеризации (обтусифолиол **68D**) подвергается очередному деметилированию. Аналогично деметилированию 4-метильной группы, стерин **68D** последовательно окисляется в спирт **82**, альдегид **83** и кислоту **84** [86-91]. Последующее стереоспецифичное деформилирование приводит к диену **70D**, который под действием 14-редуктазы стереоселективно восстанавливается до олефина **72D** [92-95]. Продукт восстановления подвергается изомеризации в  $\Delta^7$ -стероид **74D**. Изомеризация  $\Delta^8$ -связи катализируется  $\Delta^8$ - $\Delta^7$ -изомеразой и включает два этапа: протонирование  $\Delta^8$  связи и отрыв протона от C<sub>7</sub>. кДНК (*Arabidopsis thaliana*) кодирует белок, в котором 35% аминокислотных остатков идентичны изомеразе мышей [96-98]. Полученный  $\Delta^7$ -стероид подвергается последующей модификации боковой цепи, заключающейся в алкилировании под действием метилтрансферазы (SMT2) [76, 99-101]. Последующее очередное 4-деметилирование, протекающее аналогично первому удалению 4 $\alpha$ -метильной группы, приводит к  $\Delta^7$ -авенастерину **75F** [102, 103]. Полученный стероид **75F** содержит полностью сформированный углеродный скелет стигмастерина **77R**. Последующие реакции дегидрирования и восстановления приводят к изофукостерину **77F** [103-105]. В результате трансформаций, катализируемых изомеразой и редуктазой, изофукостерин **77F** превращается в ситостерин **77I** [106, 107]. Последующее дегидрирование ситостерина **77I**, катализируемое  $\Delta^{22}$ -десатуразой, приводит к целевому стигмастерину **77R** [108-110].



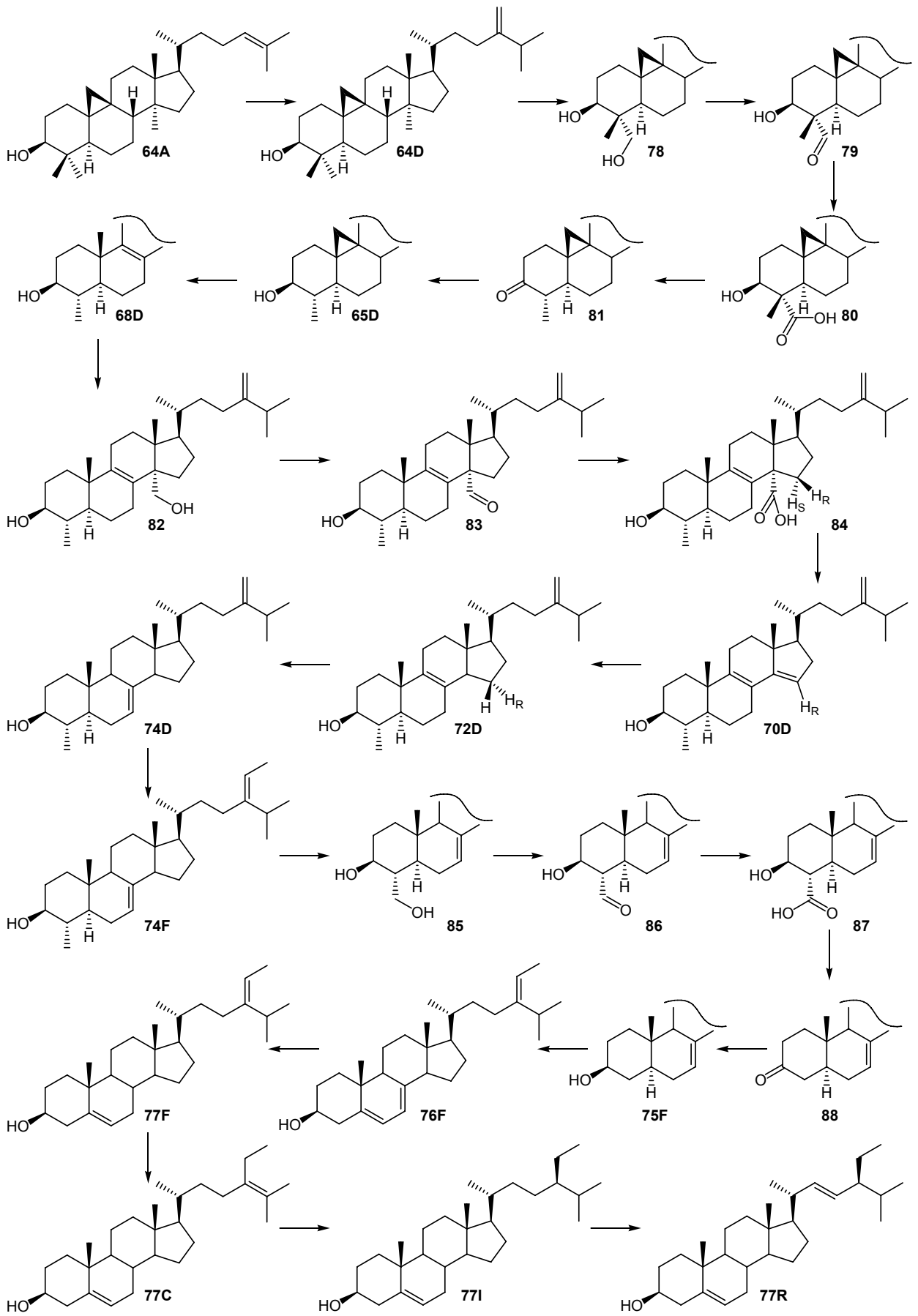


Схема 1.14

### 1.3.2. Разветвления в биосинтезе боковой цепи фитостероидов

Большой вклад в разнообразие фитостероидов вносят возможные биосинтетические бифуркации при построении боковой цепи (Схема 1.15). Данные трансформации могут происходить как на ранних, так и на более поздних стадиях биосинтеза [108]. Разнообразие различных вариантов боковых цепей основано на комбинации реакций:

- алкилирования (фермент – метилтрансфераза),
- восстановления (фермент – редуктаза),
- дегидрирования (фермент – десатураза),
- изомеризации (фермент – изомераза),

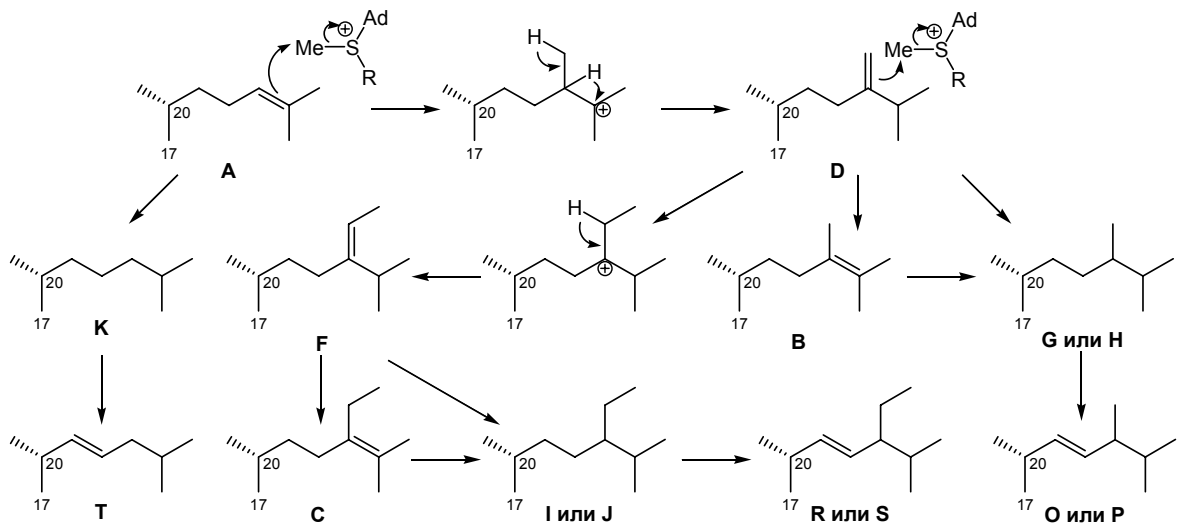


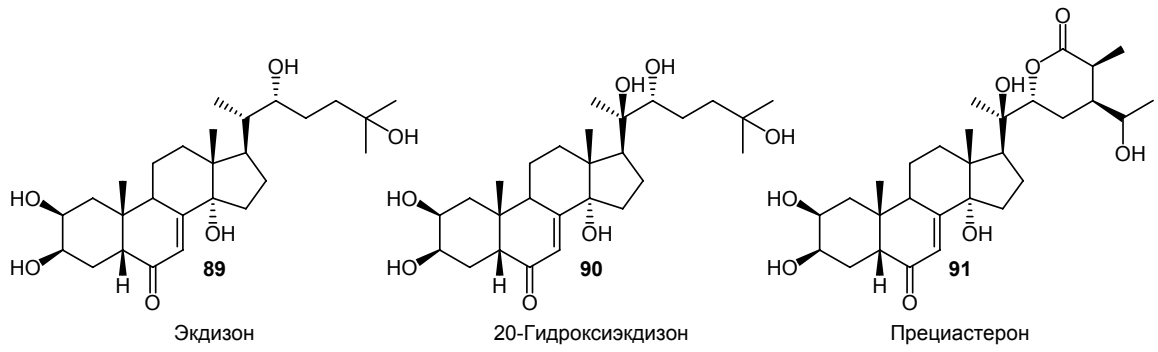
Схема 1.15

### 1.3.3. Биосинтез фитостероидов

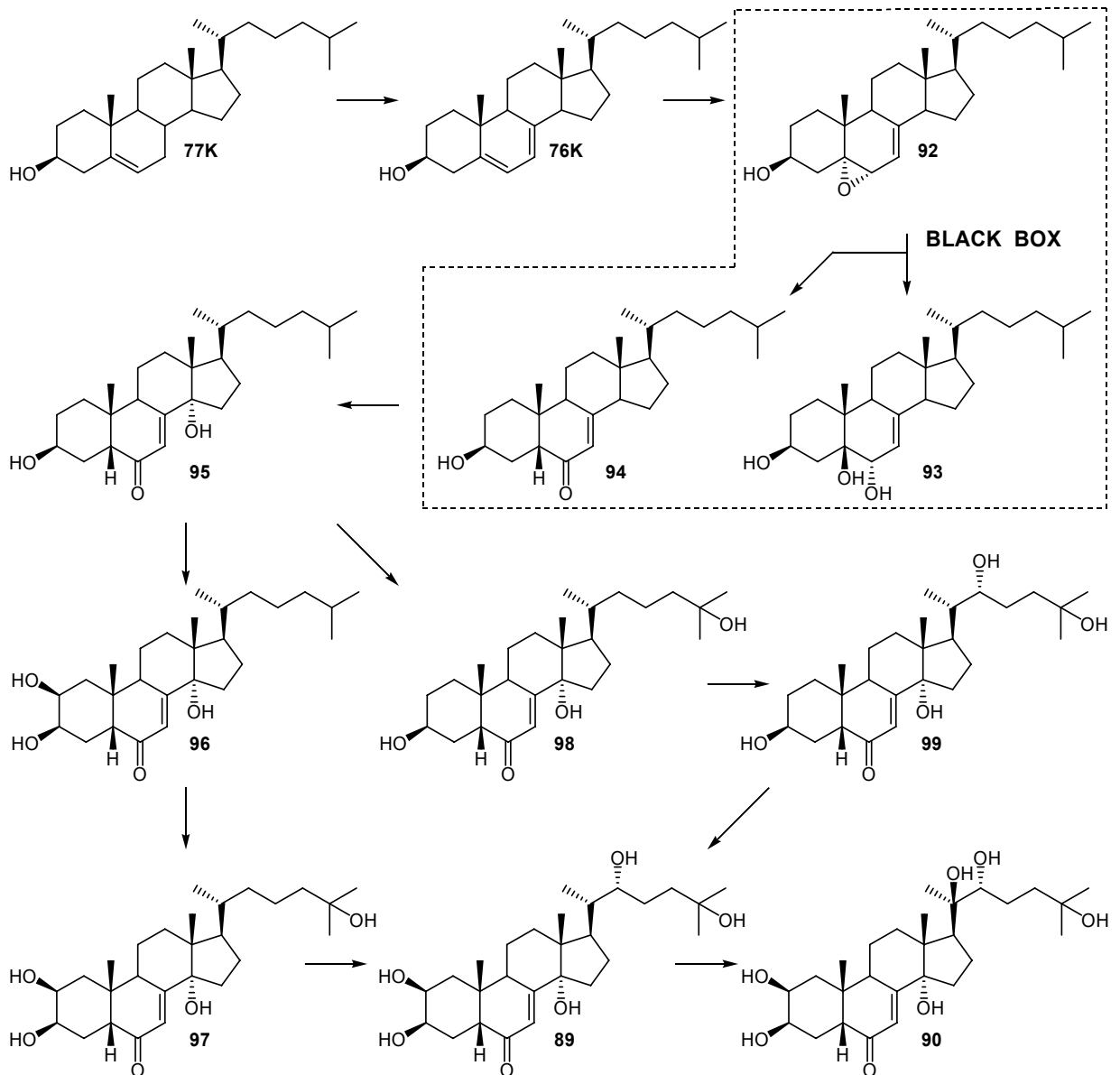
Экдистероиды являются стероидными гормонами насекомых, которые регулируют эмбриональное и постэмбриональное развитие насекомых.

Аналоги экдистероидов (фитостероиды) распространены в растениях. Считается, что они выполняют защитные функции, предохраняя растения от неадаптированных к экдизонам растениеядных насекомых и/или грунтовых нематод [111-115]. Фитостероиды – один из больших классов, насчитывающий более 150 соединений. С биосинтетической точки зрения, фитостероиды представляют полиоксистероиды, для которых характерно (Рисунок 1.4):

- цис-сочленение циклов А и В,
- наличие 6-кетогруппы, сопряженной с  $\Delta^7$ -связью,
- наличие 14 $\alpha$ - и 22 $\beta$ - гидроксигрупп,
- различные комбинации гидроксирования цикла А и боковой цепи.



**Рисунок 1.4** Структуры некоторых фитоэkdистероидов



**Схема 1.16**

Холестерин **77K** является биосинтетическим предшественником фитоэkdистероидов в растениях (Схема 1.16). В результате реакции, катализируемой  $\Delta^7$ -десатуразой, холестерин **77K** трансформируется в 7-

дегидрохолестерин **76К** [116, 117]. К сожалению, многочисленные эксперименты не позволили точно установить дальнейшие биосинтетические трансформации. Наиболее близким по структуре метаболитом дегидрохолестерина **76К** является  $5\beta$ -дигидроксикетон **95**. В виду отсутствия данных о интермедиатах, которые участвуют в трансформации дегидрохолестерина **76К** в  $5\beta$ -дигидроксикетон **95**, их объединяют под названием “black box”. Одна из причин существования “black box” – лабильность гипотетических интермедиатов в условиях проведения экспериментов, не позволяющая установить реальные биотрансформации. Наиболее вероятным интермедиатом из “black box” в растениях является эпоксистероид **92**, как было предложено [118-120]. Эпоксистероид **92** может являться предшественником  $5\beta$ -кетола **94** и триола **93** [121]. Причем, следует отметить, что  $6\beta$ -протон эпоксистероида **92** в корнях *Ajuga* мигрирует к  $C_5$   $5\beta$ -кетола **94**. Кроме того, биотрансформация триола **93** может сводиться к  $5\beta$ -кетолу **94** и/или к бомбикостеролу, который в отличие от других экистероидов содержит гидроксигруппы при  $C_5$  и  $C_6$  [119, 121]. Также следует учитывать возможность введения  $\Delta^7$ -связи  $5\beta$ -кетола **94** на поздних стадиях [122]. Как, было показано полученный  $5\beta$ -кетол **94** является промежуточным соединением при трансформации 7-дегидрохолестерина **76К** в  $5\beta$ -кетодиол **95** в корнях *Ajuga* [123].

Дальнейшие трансформации заключаются в стереоселективном полигидроксилировании  $\beta$ -кетодиола **95**, ведущие к структуре экидизона **89** [119, 124-126]. Возможны альтернативные пути полигидроксилирования, предпочтительными из которых являются те, что протекают через интермедиаты **96**, **97** и через соединения **98**, **99**. Одним из наиболее распространенных фитоэкистероидов является 20-гидроксиэкидизон **90**, продукт стереоселективного гидроксилирования экидизона **89** [119, 127-130].

Описанные пути биосинтеза фитоэкистероидов не являются исчерпывающими, так как следует предполагать существование биотрансформаций аналогичных изученным для животных. Также возможно различие в наблюдаемых путях биосинтеза экистероидов в зависимости от растения [119, 131, 132].

#### **1.3.4. Биосинтез brassinостероидов**

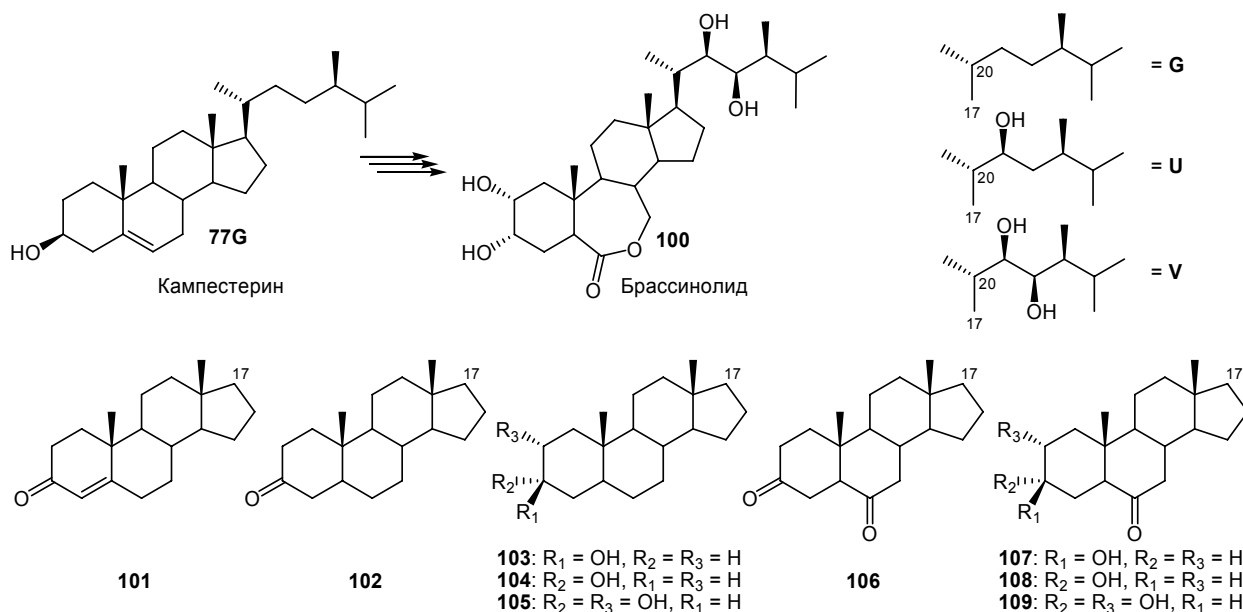
Новым импульсом для изучения стероидов растений явилось открытие brassинолида, родоначальника класса растительных гормонов – brassinостероидов [133]. Brassinостероиды являются регуляторами роста растений и увеличивают устойчивость к неблагоприятным факторам и влияют на процессы развития растений [134-144]:

- развитие,
- цветение,
- созревание,

- старение.

С химической точки зрения brassinостероиды, как и экдизоны, относятся к классу полиоксистероидов. Для brassinостероидов характерно:

- транс-сочленение циклов А и В,
- наличие 6-кетогруппы или 6-сложноэфирной группы (лактон),
- наличие 22 $\alpha$ - и 23 $\alpha$ -гидроксигрупп,
- возможны различные комбинации гидроксирования цикла А и боковой цепи.

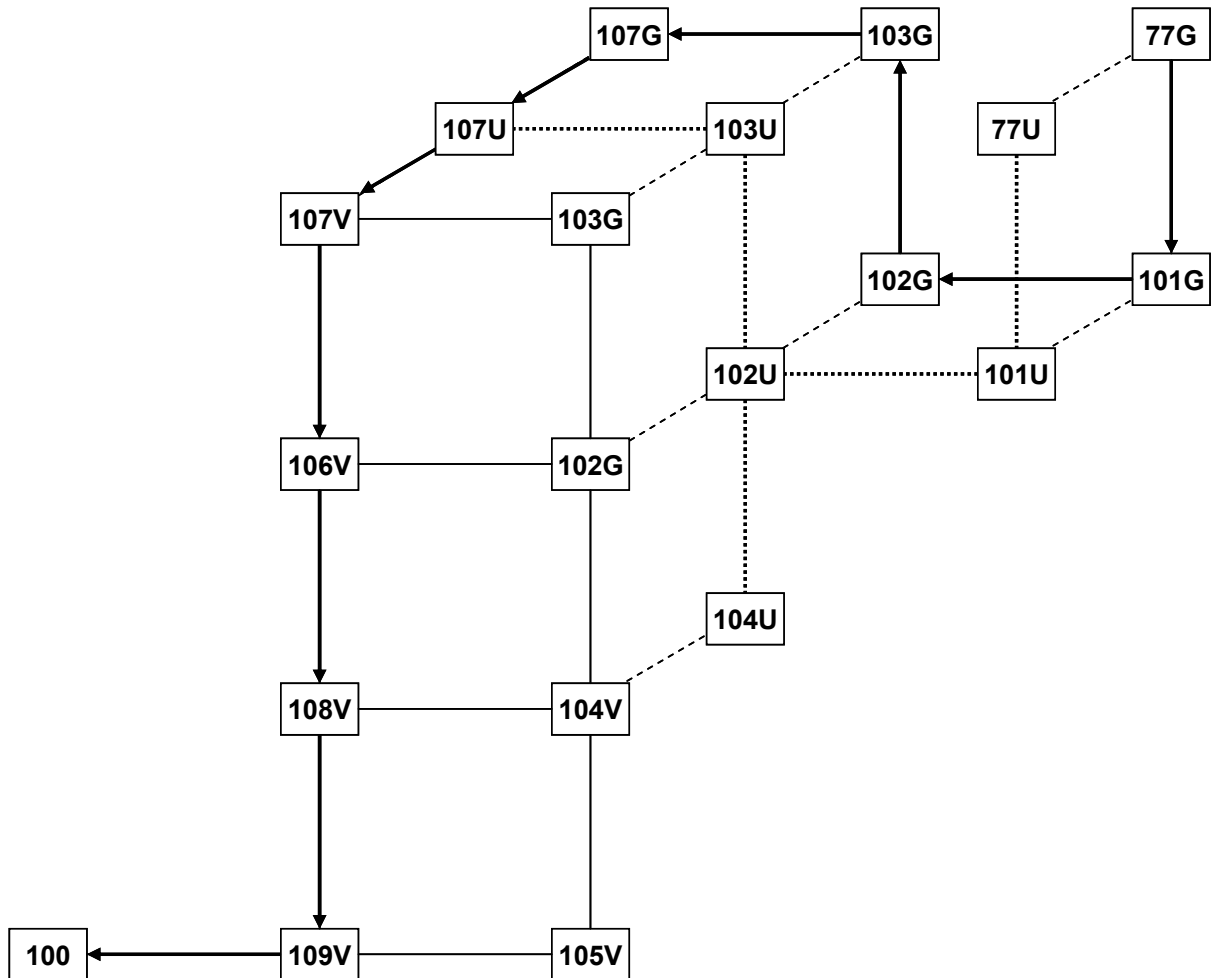


**Рисунок 1.5 Структурное разнообразие brassinостероидов**

Кампестерин **77G** – биопредшественник самого активного brassinостероида, brassинолида **100** (Рисунок 1.6). На первом этапе биосинтез brassинолида **100** заключается в формировании углеродного скелета, т.е. восстановлении  $\Delta^5$ -связи. В отличие от животных, где восстановление контролируется 5 $\alpha$ -редуктазой и проходит в одну стадию, данный этап включает серию трансформаций [145]. Кампестерин **77G** в результате последовательных реакций, катализируемых изомеразой и оксидазой, превращается в кампест-4-ен-3-он **101G**. Последующее стереоспецифическое восстановление приводит к кетону **102G**, формируя транс-А/В-сочленение колец в циклической стероидной части [146]. Формирование скелета заканчивается стереоселективным восстановлением кетона **102G** в кампестанол **103G** [147]. Последовательность реакций, трансформирующих кампестерин **77G** в кампестанол **102G**, получила название “позднее С-22 окисление”. Альтернативный путь, приводящий к 22-гидроксикампестанолу **102U** из кампестерина **77G**, получил название “раннее С-22 окисление” [148].

Дальнейшие трансформации заключаются в окислении кампестанола **102G**. Существует две альтернативные последовательности реакций – “раннее С-6 окисление” и “позднее С-6 окисление”, – которые различаются

последовательностью введения 6-кетофункции. Предполагается, что биосинтез через “раннее С-6 окисление” превалирует в светлое время суток, а через “позднее С-6 окисление” – в темное [149]. 6 $\alpha$ -Гидроксилирование кампестанола **102G** и последующее окисление полученного интермедиата приводит к 6-кетокампестанолу **107G**. 22 $\alpha$ -Стереоселективное окисление 6-кетокампестанола **107G** приводит к катастерону **107U**, который подвергается последующему гидроксилированию до теастерона **107V** [150]. Теастерон **107V** содержит полностью сформированную боковую цепь brassinостероидов. Последующие трансформации заключаются в формировании цикла А. Теастерон **107V** окисляется в дикетон **106V**, который восстанавливается до тифастерина **108V**. Следует обратить внимание на неселективность восстановления 3-кетогруппы, о чем свидетельствует наличие обратимого равновесия между теастероном **107V** и тифастерином **108V** [151]. Результатом последующего 2 $\alpha$ -гидроксилирования является кастастерон **109V**, который является конечным продуктом окисления по второму альтернативному пути биосинтеза “позднее С-6 окисление” [152-156]. Ферментативное окисление по Байеру-Виллигеру приводит к конечному продукту, brassинолиду, который является наиболее активным brassinостероидом [157, 158].



*Рисунок 1.6 Биосинтез brassинолида.*

### 1.3.5. Биосинтез сапогенинов и стероидных алкалоидов

Производные стероидных сапогенинов растений являются токсичными и выполняют защитные функции. С биосинтетической точки зрения сапогенины представляют собой спиросоединения, продукты метаболизма холестерина **77К**. Спирокетальная функция получается в результате последовательной серии реакций гидроксирования при C<sub>16</sub> и C<sub>26</sub> и затем введения кетофункции при C<sub>22</sub> и последующего образования метаболита (Схема 1.17). Предполагается, что замыкание цикла проходит через образование гемикетала **112**, а стереохимия определяется способом формирования кетала. Наиболее распространенным среди сапогенинов является диосгенин **114** [159, 160].

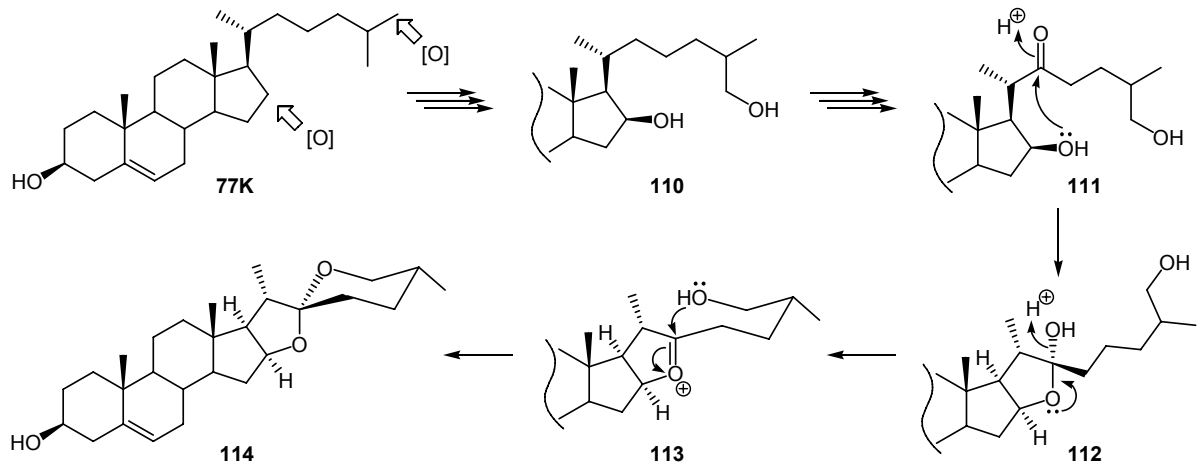


Схема 1.17

Стероидные алкалоиды являются азотсодержащими аналогами сапогенинов и проявляют подобные свойства (Схема 1.18). Их биосинтез включает последовательность реакций окисления, а затем через транс-аминирование с использованием аминокислот вводится атом азота. После формирования азотсодержащего цикла происходит превращение в спиросоединения. Томатин **119**, распространенный в различных сортах томатов, является примером стероидных алкалоидов [160-162].

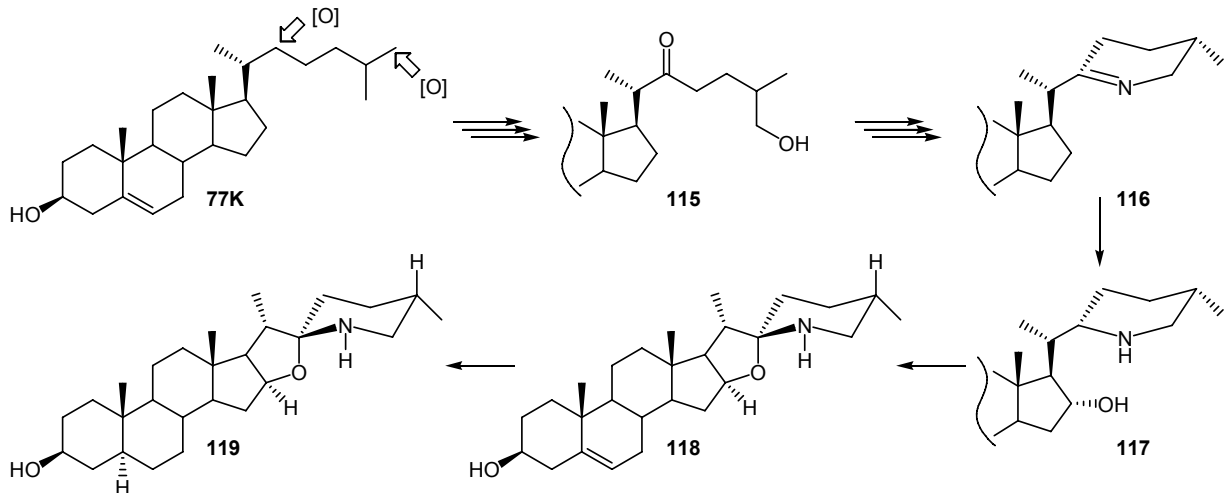


Схема 1.18

### 1.3.6. Биосинтез витанолидов

Витанолиды это С-28-стероиды, содержащие лактон в боковой цепи (Рисунок 1.7). Для витанолидов характерны различные кислородсодержащие функциональные группы. Витанолиды проявляют противоопухолевую и иммунодепрессивную активность, приводят к дифференциации клеток и являются антагонистами экистероидных рецепторов. Биосинтез данного класса соединений окончательно не изучен. Однако установлено, что биопредшественником витанолидов является 24-метилхлестерин **77D**, который в результате дальнейших биотрансформаций теряет изопропильный фрагмент (разрыв  $C_{24}$ - $C_{25}$  связи) или  $C_{26}$ -атом [163-166].

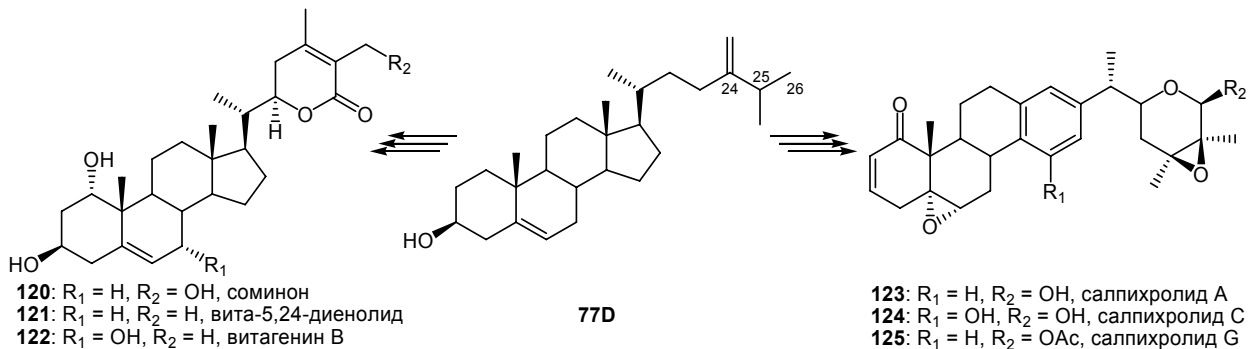


Рисунок 1.7 Биосинтез витанолидов.

### 1.3.7. Биосинтез прогестинов

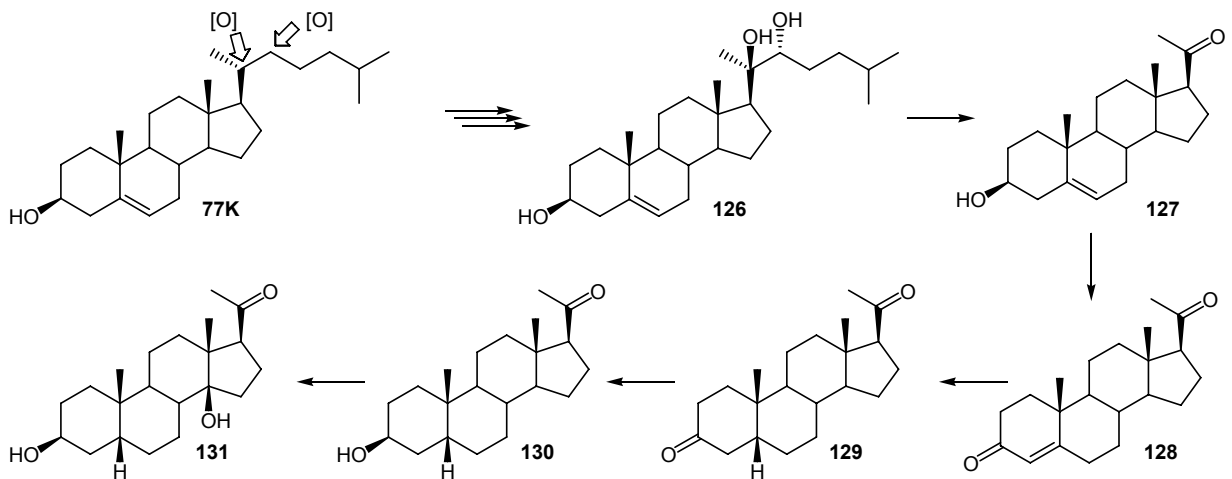


Схема 1.19

Прогестины (гестагены) являются типичными С-21-стероидными гормонами животных, однако также они могут быть найдены в растениях [167-170]. Биосинтез прогестинов в растениях аналогичен изученному для животных. Биосинтетическим предшественником является холестерин **77K** и/или аналогичные ему фитостерины (Схема 1.19). В результате стереоконтролируемого гидроксирования холестерина **77K** при  $C_{22}$ , а затем и при  $C_{20}$  получается триол **126**. Ключевой стадией биосинтеза прогестинов является разрыв  $C_{20}$ - $C_{22}$ -связи, приводящий к прегненолону **127**. В результате последующего окисления 3-гидрокси группы и



кетто-енольной таутомеризации получается прогестерон **128** – типичный представитель прогестинов. Следует отметить, что кетодиол **131** является предшественником стероидов растений: карденолидов, буфадиенолидов. Биосинтез кетодиола **131** включает последовательность стереоконтролируемых реакций: восстановление  $\Delta^4$ -связи соединения **129**, восстановление 3-кетогруппы продукта **130** и 14 $\beta$ -гидроксилирование с изменением конфигурации C<sub>14</sub>-центра [169, 171-174].

### 1.3.8. Биосинтез карденолидов

Карденолиды являются кардиоактивными соединениями. С химической точки зрения это C<sub>23</sub>-стероиды, содержащие сопряженный пятичленный лактонный цикл. Гидроксилирование кетодиола **131** приводит к образованию триола **132**, аналога кортикостероидов (Схема 1.20). Последующие ключевые стадии формирования лактонного цикла заключаются в присоединении малонил-СоА с образованием сложного эфира **133**, а затем альдольного присоединения, сопровождающегося декарбоксилированием с образованием пятичленного лактона **135**. Дегидрирование лактона **135** приводит к дигитоксигенину **136** [169, 174-176].

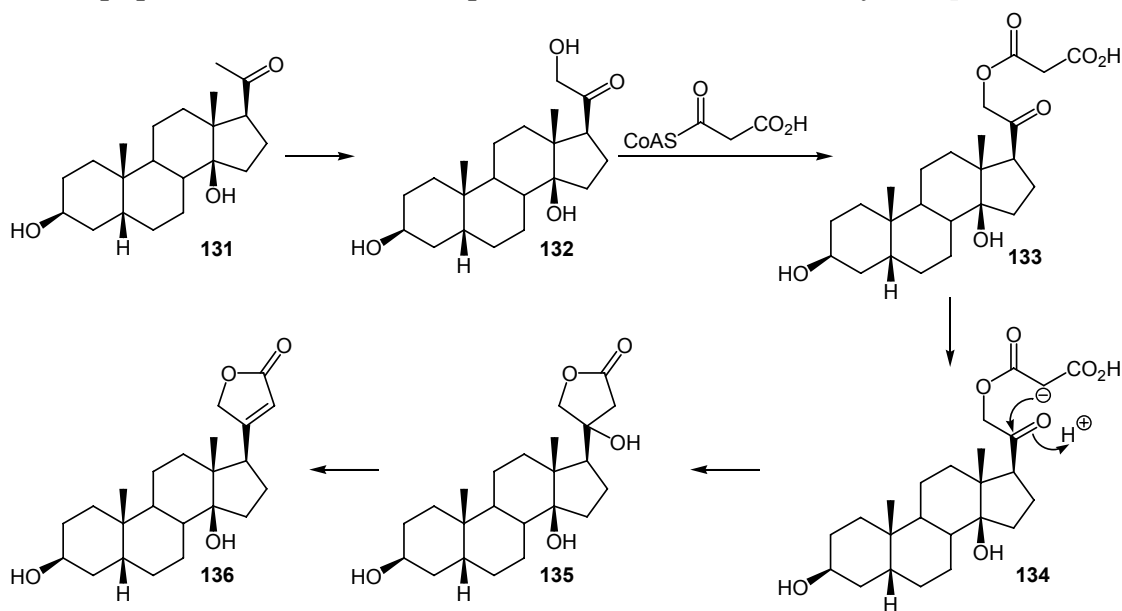


Схема 1.20

### 1.3.9. Биосинтез буфадиенолидов

Буфадиенолиды являются аналогами карденолидов. С химической точки зрения, это C<sub>24</sub>-стероиды, содержащие сопряженный шестичленный лактонный цикл. В отличие от биосинтеза карденолидов, биосинтез буфадиенолидов основан на реакции присоединения ацетилксалил-СоА к триолу **132**, которая приводит к образованию сложного эфира **137** (Схема 1.21). Последующее альдольное присоединение, сопровождающееся декарбоксилированием, формирует шестичленный лактонный цикл **139**. В результате дегидрирования лактона **139**

получается соединение с предпочтительной сопряженной системой **140**. Последующие реакции восстановления кетогруппы и 1,4-элиминирования приводят к образованию буфалина **142** [176-178].

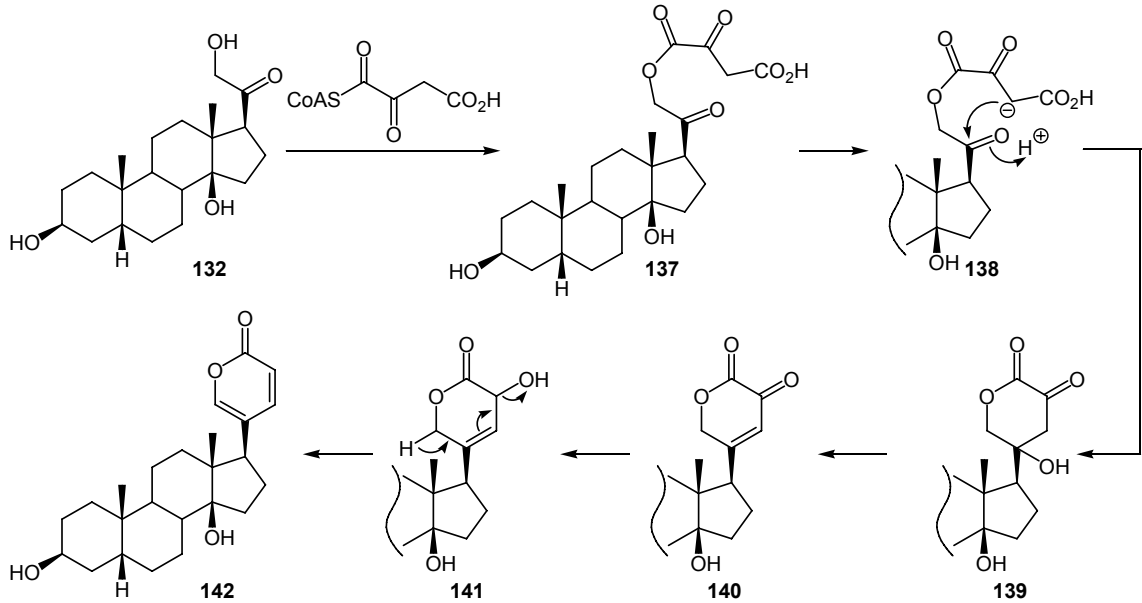


Схема 1.21

### 1.3.10. Биосинтез витаминов D

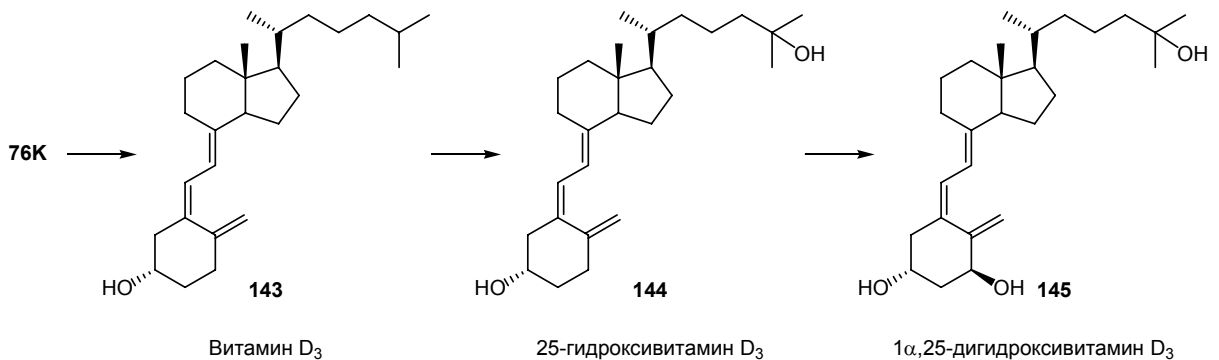


Схема 1.22

Витамины группы D являются соединениями стероидного происхождения. В растениях, как и у животных, они отвечают за транспорт ионов кальция [179]. Предшественником данного класса соединений является 7-дегидрохолестерин **76К**, который трансформируется в витамин D<sub>3</sub> **143** (Схема 1.22). В результате последующего гидроксилирования витамин D<sub>3</sub> **143** превращается в 25-гидроксивитамин D<sub>3</sub> **144**, а затем в 1 $\alpha$ ,25-дигидроксивитамин D<sub>3</sub> **145**, аналогично реакциям имеющих место у животных. Однако остается неизвестным механизм раскрытия цикла В. В результате проведенных экспериментов было установлено, что биосинтез витаминов D<sub>3</sub> из 7-дегидрохолестерина **76К** возможен даже в темноте и количество образованных метаболитов описывается функцией от времени инкубации. На основании этих данных было сделано заключение о

возможном ферментативном раскрытии цикла В и предложен возможный его механизм [180-182].

### **Выводы**

Анализ литературных данных по биосинтезу стероидных соединений в высших растениях позволяет сделать ряд выводов:

- биосинтез любого из стероидных соединений в высших растениях – это сложная комбинация последовательных элементарных трансформаций, которые регулируются комплексом независимых факторов;
- биосинтез одного конкретного соединения может происходить разными путями, которые находятся во взаимосвязи позволяющей нивелировать результат блокирования одного из путей;
- не для всех стероидных соединений изучены механизмы биосинтеза, что служит препятствием для адекватной оценки их места в гормональной иерархии стероидов у того или иного вида;
- изучение биосинтетических превращений имеет большое значение не только для понимания места того или иного биорегулятора в цепи сигнальных событий в клетке, но и для прогнозирования наиболее активных структур и создания на этой основе высокоэффективных препаратов избирательного действия.

## 2. СИНТЕЗ ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ 24 $\alpha$ -МЕТИЛБРАССИНО-СТЕРОИДОВ. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА БРАССИНОЛИДА

(обсуждение результатов)

При исследовании пыльцы рапса *Brassica napus L.* был выделен новый фитогормон стероидного происхождения, названный brassинолидом [133]. Впервые было показано, что стероиды могут обладать гормональной функцией, не только у человека и млекопитающих, насекомых, но также и у растений. Дальнейшее изучение растительного материала позволило выделить ряд стероидов, проявляющих сходную биоактивность. Класс соединений, образованный ими, получил название “brassinостероиды”. Исследования по выделению brassиностероидов из растительных источников показывают, что их наличие характерно для всех растений. К настоящему времени установлены структуры более 60 соединений этого класса, проявляющих различные виды регуляторного воздействия на рост и развитие растений. Они содержат brassиностероиды в очень низких концентрациях (менее 10<sup>-8</sup>%) и только в отдельных случаях содержание достигает 10<sup>-5</sup>%. Поэтому единственным средством удовлетворения потребности в brassиностероидах как для научных, так и для прикладных целей является их химический синтез [134-136, 138, 141, 183-186]. Существенно, что только этим путем возможно получение модифицированных brassиностероидов (в том числе изотопномеченых), которые являются необходимым инструментом для проведения аналитических и биосинтетических исследований.

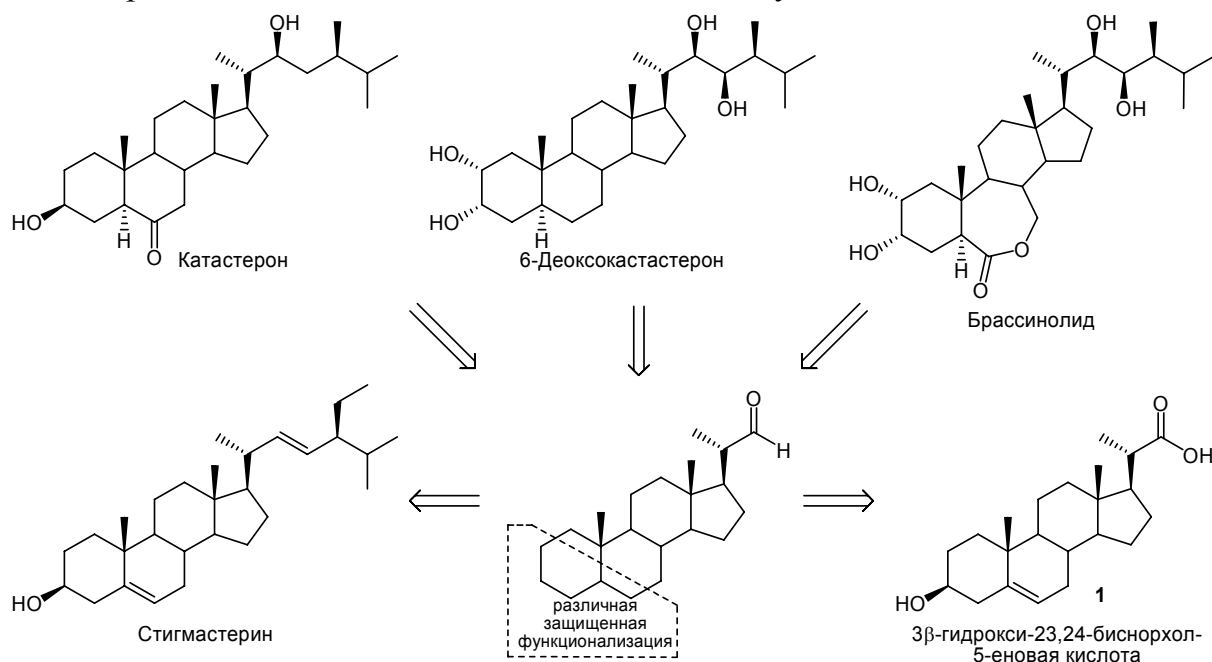
Имея конечной целью выяснение особенностей биосинтеза brassинолида на примере трех растительных видов (*Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*), настоящее исследование включало два основных раздела:

- химический синтез brassиностероидов, их аналогов, биопредшественников и меченых производных,
- разработку методов выделения и анализа brassиностероидсодержащих фракций растительного материала и проведение биосинтетических экспериментов.

### 2.1. Синтез С<sup>22</sup>-альдегидов

В связи с широким спектром действия стероидных препаратов на биосистемы и растущим пониманием роли стероидов, как универсальных биорегуляторов различных организмов исследования данного класса природных соединений приобретают большое значение в современной науке. Одной из основных проблем, решение которой определяет прогресс в данной области, является малая доступность стероидов для исследователей. Только отдельные

представители данного класса соединений могут быть выделены из биоматериала в достаточных количествах и с удовлетворительной степенью чистоты. Выделение в индивидуальном состоянии многих биологически активных стероидов (брасиностероидов, экидистероидов, витанолидов и др.) из природных источников представляет крайне сложную задачу вследствие низкого естественного содержания и/или сложности выделения, очистки. Поэтому химический синтез таких стероидов – единственная возможность их получения.



**Рисунок 2.1 Ретросинтез брасиностероидов**

Полный химический синтез брасиностероидов является сложной задачей из-за необходимости стерео-контролируемого формирования циклической части и боковой цепи. Наиболее удобный путь синтеза – частичный синтез на основе доступных  $\Delta^{22}$ -стероидов, таких как стигмастерин, эргостерин (Рисунок 2.1) молекулярная структура которых позволяет осуществить синтез ряда брасиностероидов без реконструкции углеродного скелета. При необходимости реконструкции (например, в случае синтеза брасинолида и других  $24\alpha$ -метилбрасиностероидов) методы синтеза обычно включают трансформацию  $\Delta^{22}$ -связи в  $C^{22}$ -альдегиды – ключевые интермедиаты синтеза многих стероидов. Данные методы предполагают использование токсичных дорогих реагентов на основе тетраоксида осмия, или наличие специального оборудования (в случае использования озона). Для осуществления наиболее эффективной конвергентной схемы синтеза, ключевые альдегиды должны содержать защищенную функциональность в циклической части, удобную для последующих трансформаций [186, 187].

Разработанные нами новые методы синтеза различных защищенных  $C^{22}$ -альдегидов на основе коммерчески доступной  $3\beta$ -гидрокси-23,24-биснорхол-5-

еновой кислоты **1** исключают использование дорогих реагентов или специфического оборудования, и с успехом могут быть применены для крупномасштабного синтеза.

### 2.1.1. Синтез (20S)-6β-метокси-20-формил-3α,5-цикло-5α-прегнана

Большинство природных стероидов содержат гидроксигруппу 3β-положении и Δ<sup>5</sup> связь [3, 186], как и в исходной кислоте **1**, выбранной для синтеза. Однако в целевом альдегиде данный фрагмент должен быть защищенным, так как предполагается в дальнейшем использовать его для формирования боковой цепи. Ввиду того, что наиболее часто для этого используются металлоорганические реагенты, защита должна быть устойчива в условиях последующих реакций [186-189]. Наиболее удобным вариантом защиты является использование изо-стероидной перегруппировки для предварительно полученного мезилата или тозилата.

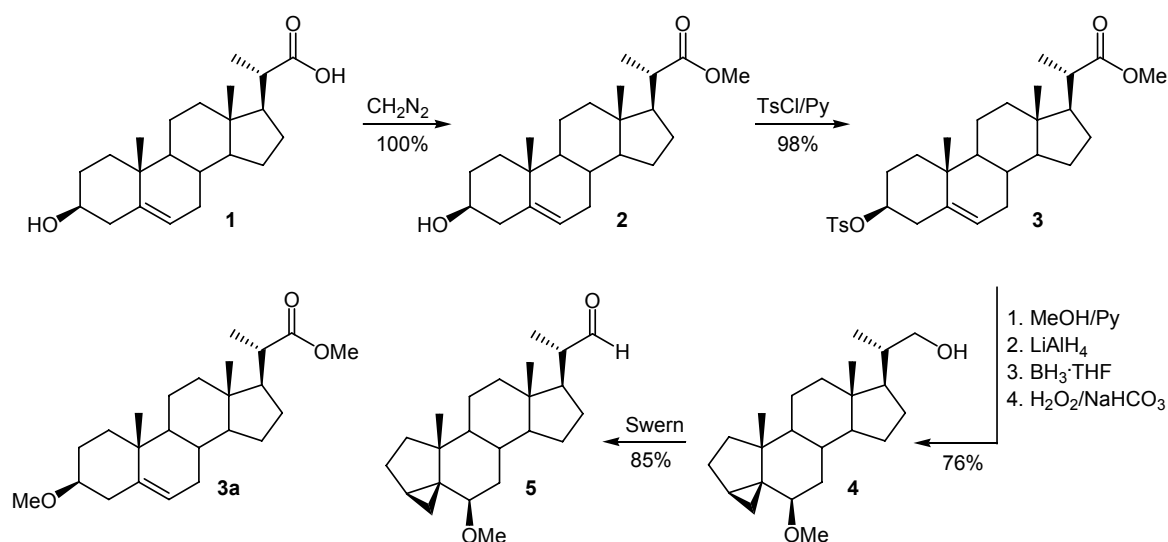


Схема 2.1

Тозилат **3** (Схема 2.1), полученный последовательной обработкой кислоты **1** диазометаном и тозилхлоридом, использовали для изо-стероидной перегруппировки в метаноле. Продукт реакции представлял неразделимую смесь целевого 3α,5-циклопроизводного и олефина **3a** (10% по данным ПМР-спектра). Последующее восстановление полученного продукта с помощью LiAlH<sub>4</sub> также привело к неразделимой смеси спиртов. Для выделения целевого спирта **4** продукт восстановления олефина **3a** трансформировали в полярный продукт последовательной обработкой BH<sub>3</sub>·THF и раствором H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В результате спирт **4** был выделен с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. В ПМР-спектре спирта **4** присутствуют два однопротонных дублета дублетов при δ 3.37 м.д. и 3.64 м.д., принадлежащие протонам первичной спиртовой группы, что соответствует литературным данным [190]. Окисление полученного спирта **4** по Сверну привело к желаемому альдегиду **5** с выходом 63% в расчете на кислоту **1**. В

ПМР-спектре альдегида **5** присутствует однопротонный дублет альдегидного протона при  $\delta$  9.58 м.д. Сохранение исходной конфигурации при  $C^{20}$  в условиях проведенной последовательности реакций подтверждается величиной КССВ протона при  $C^{22}$ , равной 3.3 Гц [191, 192]. В случае, протекания эпимеризации по  $C^{20}$  КССВ этого протона имеет значение равное 5.0 Гц [193]. Сигналы протонов альдегида **5** при  $C^{21}$  и  $C^{18}$  находятся при  $\delta$  1.12 м.д. и 0.77 м.д., в то время как у (20*R*)-альдегида при  $\delta$  1.04 м.д. и 0.73 м.д., соответственно [193].

### 2.1.2. Синтез (20*S*)-6-(1,3-диоксолан-2-ил)-20-формил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -прегнана

Альдегиды, содержащие защищенную кетогруппу в шестом положении, являются ключевыми интермедиатами в синтезе брассиностероидов [186] и экидистероидов. Удобный метод трансформации 3 $\beta$ -гидрокси- $\Delta^5$ -стероидов в 6-кетосоединения включает использование изо-стероидной перегруппировки в присутствии ацетатов щелочных металлов и воды с последующим окислением образовавшегося спирта до кетона [186].

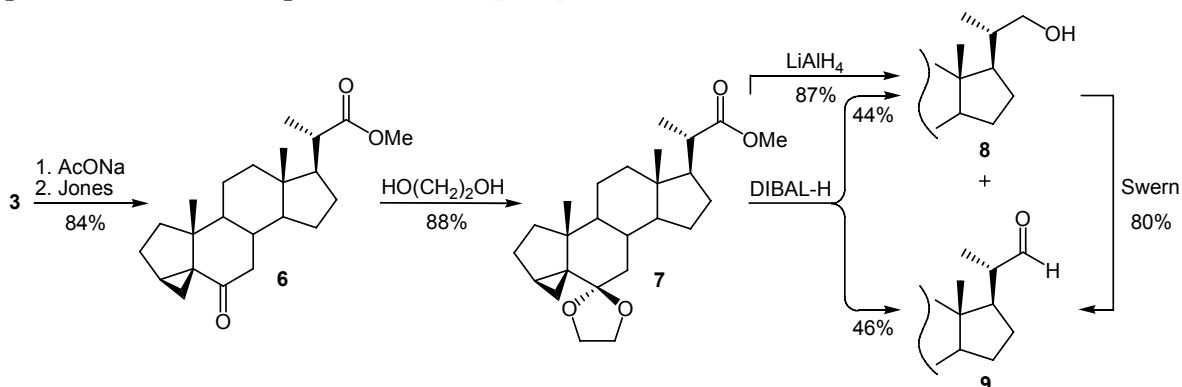


Схема 2.2

Изо-стероидная перегруппировка тозилата **3** (Схема 2.2) и окисление по Джонсу привели к кетозефиру **6**. В результате последующей защиты кетогруппы обработкой этиленгликолем в хлористом метиле в присутствии триэтилортомуравьиного эфира и толуолсульфокислоты был получен эфир **7**. Следует отметить, что кипячение в бензоле в присутствии этиленгликоля и толуолсульфокислоты приводит к образованию смеси эфира **7** и его  $C^{20}$ -эпимера. Восстановление эфира **7** диизобутилалюминийгидридом привело к смеси спирта **8** и альдегида **9**. Даже в случае неполной конверсии эфира **7** наблюдается одновременное образование обоих продуктов, что говорит о большей легкости восстановления альдегида **9** в спирт **8**, чем эфира **7** в альдегид **9**. Наиболее удобным оказалось исчерпывающее восстановление эфира **7** в спирт **8** с последующим окислением по Сверну. Альдегид **9** синтезирован с выходом 50% в расчете на кислоту **1**. В ПМР-спектре соединения **9** присутствует однопротонный дублет альдегидного протона при  $\delta$  9.57 м.д. Сохранение исходной конфигурации  $C^{20}$  в условиях проведенной последовательности реакций подтверждается

величиной КССВ протонов при  $C^{22}$ , равной 3.0 Гц и соответствует литературным данным [194].

### 2.1.3. Синтез (20S)-3,6-ди(1,3-диоксолан-2-ил)-20-формил-5 $\alpha$ -прегнана

Значительное количество интересных природных стероидов содержат 3- и 6-кетогруппы и в то же время они являются удобными интермедиатами для синтеза других полифункционализированных соединений [195-197]. В связи с планируемым получением 3,6-дикетостероидов с различными боковыми цепями для нас был интересен синтез защищенного 3,6-дикето- $C^{22}$ -альдегида. Введение кетогрупп в циклическую часть основывалось на окислительном гидроборировании  $\Delta^5$ -связи, приводящем к образованию 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -дигидроксисоединения, и последующем окислении полученного диола.

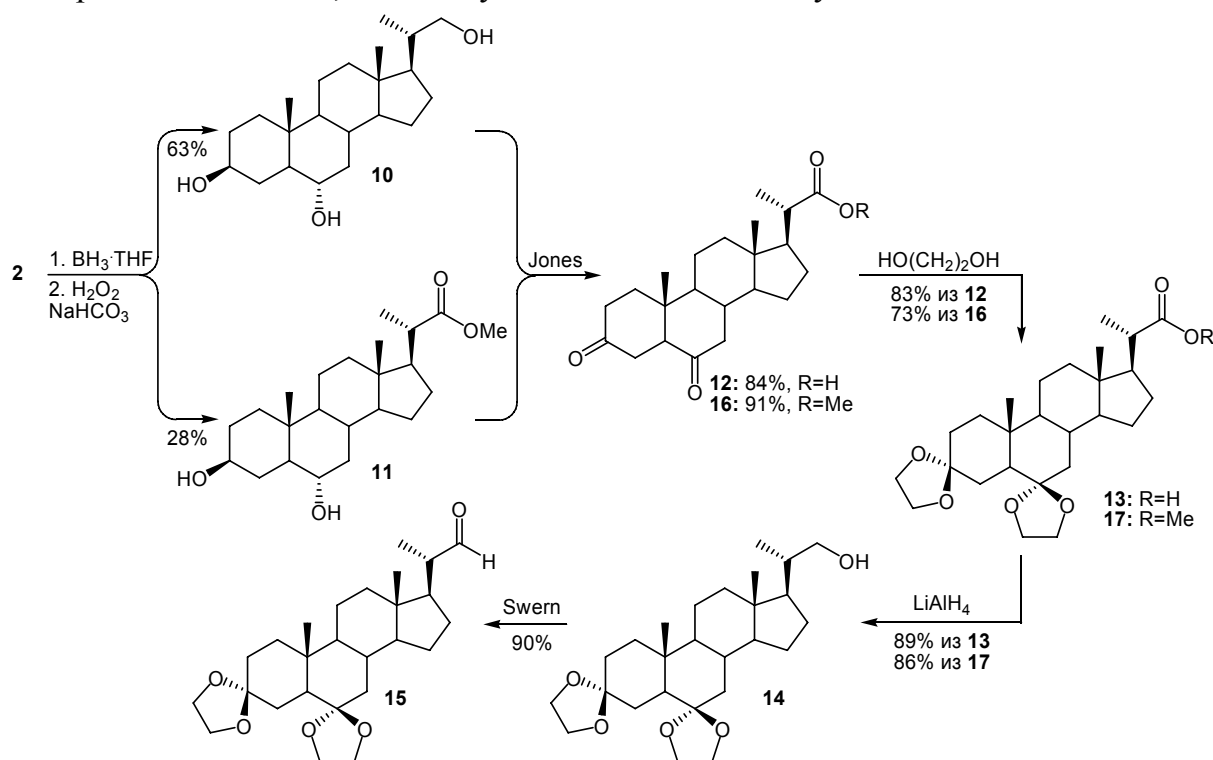
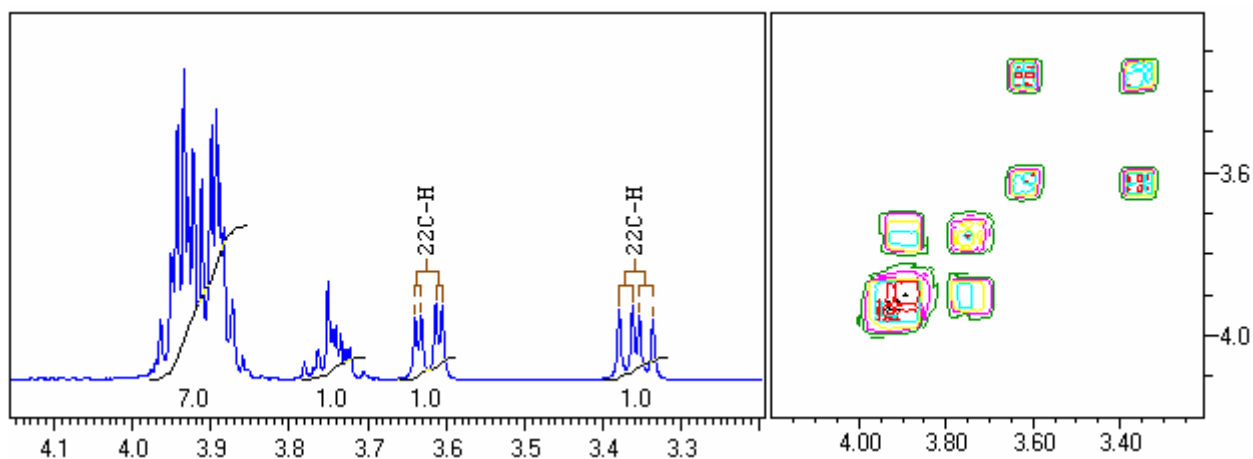


Схема 2.3

Окислительное гидроборирование эфира **2** привело к смеси триола **10** и дигидроксиэфира **11** (Схема 2.3). Оптимальным оказалось использование 15 эквивалентов комплекса борана с тетрагидрофураном. Так, при использовании 4 эквивалентов комплекса соотношение продуктов **10/11** равнялось 1:10, которые выделены с общим выходом 53%. Увеличение количества комплекса до 15 эквивалентов привело к изменению соотношения продуктов ( $10/11 = 2:1$ ), при этом общий выход увеличился до 91%. Следует отметить, что использование гидрокарбоната натрия вместо обычно используемой щелочи на стадии окисления борана перекисью водорода было вызвано необходимостью предотвращения возможной рацемизации при  $C^{20}$ .





**Рисунок 2.2 Фрагмент ПМР-спектра спирта 14 и соответствующий ему фрагмент протон-протонной корреляции ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY)**

Защитой кетогрупп, следующей за окислением триола **10** по Джонсу до дикетокислоты **12**, и последующим восстановлением карбоксильной группы получен спирт **14**, в ПМР-спектре которого присутствуют два однопротонных дублета дублетов с  $\delta$  3.35 м.д. и  $\delta$  3.62 м.д. первичной спиртовой группы и сигнал диоксолановой группы, представленный двумя мультиплетами с  $\delta$  3.70-3.78 м.д. (1H) и  $\delta$  3.85-3.97 м.д. (7H) (Рисунок 2.2). Окислением спирта **14** по Сверну получен альдегид **15**, в ПМР-спектре которого присутствует дублет альдегидного протона ( $\delta$  9.56 м.д.) с КССВ, равной 3.2 Гц и являющейся характерной для приписанной конфигурации  $\text{C}^{20}$ . Аналогичная последовательность реакций использовалась для синтеза альдегида **15** из второго продукта окислительного гидроборирования – дигидроксиэфира **11**. Использование аналогичных реакций позволяет синтезировать альдегид **15** без разделения продуктов **10** и **11** с выходом 64% в расчете на кислоту **1**.

### Выводы

Разработаны новые методы синтеза стероидных  $\text{C}^{22}$ -альдегидов из  $3\beta$ -гидрокси-23,24-биснорхол-5-еновой кислоты **1** без использования дорогостоящих реагентов и специфического оборудования. Разработанные синтетические стратегии могут использоваться для крупномасштабного синтеза стероидов, содержащих боковую цепь. Ключевые интермедиаты в синтезе труднодоступных природных стероидов –  $\text{C}^{22}$ -альдегиды – получены с выходом 50 – 64% в 7 стадий [198, 199].

## 2.2. Синтез стероидов растений

Как отмечалось, стероиды растений имеют в своей структуре различной степени функционализированную циклическую часть и боковую цепь. Как правило, синтез соединений данного класса заключается в использовании циклической части легкодоступных стероидов, последующей ее модификации и введении

боковой цепи [186, 187, 189, 200-203]. Основной задачей данного этапа работы было разработка легко масштабируемых методов синтеза природных brassinостероидов, их производных и стеринных предшественников

### 2.2.1. Синтез кампестерина

Кампестерин (кампестерол,  $24\alpha$ -метилхолестерин) типичный, широко распространенный представитель фитостерина. Из растительного материала выделяется в виде неразделяемой смеси с  $\beta$ -ситостерином,  $\beta$ -ситостанолом и 22-дигидробрассикастерином и является недоступным в чистом виде. Смеси, содержащие кампестерин, представляют большой интерес для медицины как препараты, уменьшающие риск заболевания атеросклерозом [204-208]. В то же время, он является биопредшественником наиболее активных ростостимулирующих brassinостероидов [137, 142, 146, 148, 154, 209]. Выбранный нами метод заключался в синтезе аллильных спиртов, из предварительно полученного альдегида **5** и последующем стереоконтролируемом формировании оптического центра при  $C^{24}$ , используя перегруппировку Кляйзена.

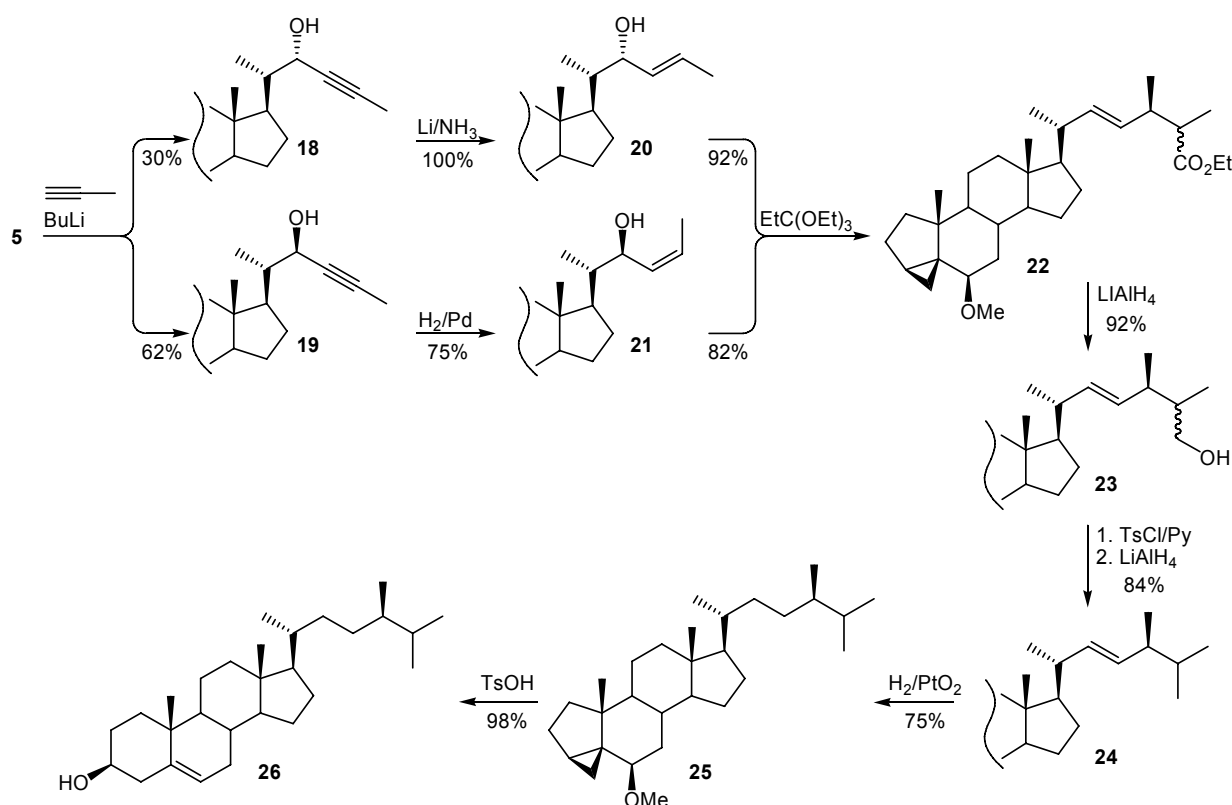
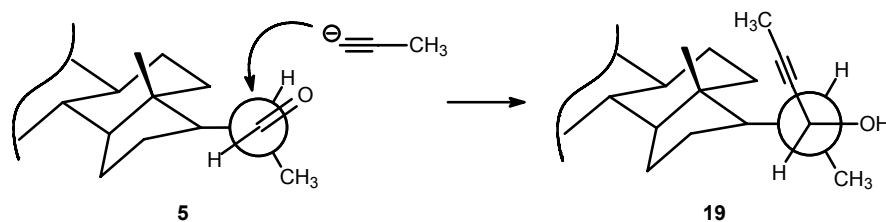


Схема 2.4

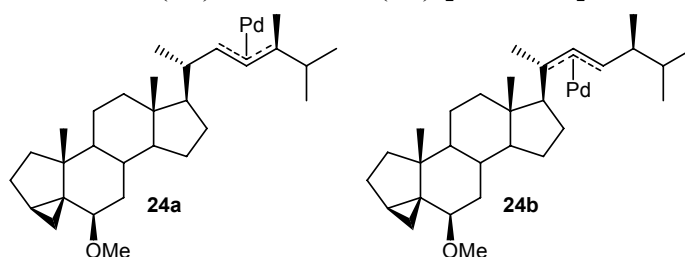
Присоединение метилацетилену к альдегиду **5** привело к смеси пропаргиловых спиртов **18** и **19** в соотношении 1:2, соответственно (Схема 2.4). Преимущественное образование спирта **19** объясняется асимметрической индукцией оптического центра при  $C^{20}$  в соответствии с правилом Крама (Рисунок 2.3). В ПМР-спектрах спиртов **18** и **19** присутствуют трехпротонные дублеты

протонов при  $C^{25}$  с  $\delta$  1.86 м.д. и 1.87 м.д., соответственно, и широкие однопротонные синглеты протонов при  $C^{22}$  ( $\delta$  4.44 м.д.). Приписанные структуры согласуются с литературными данными [210-212].



**Рисунок 2.3** Стереоселективность присоединения метилацетилененида

С целью последующего стереоселективного формирования центра  $C^{24}$  спирты **18** и **19** были трансформированы в аллильные спирты транс-**20** и цис-**21** восстановлением литием в жидком аммиаке и гидрированием над палладием, соответственно. В ПМР-спектре спиртов **20** и **21** присутствуют трехпротонные дублеты с  $\delta$  1.73 и 1.66 м.д.  $C^{25}$ -метильной группы, соответственно, и дублет дублетов с  $\delta$  4.12 м.д. в спирте **20** протона при  $C^{22}$ , в то время как в спирте **21** присутствует дублет с  $\delta$  4.57 м.д. Олефиновые протоны при  $C^{23}$  и  $C^{24}$  представлены мультиплетами с  $\delta$  5.40-5.80 (**20**) и 5.53 м.д. (**21**) [211, 212].



**Рисунок 2.4**  $\pi$ -комплексы палладиевого катализатора с соединением **24**

Последующее присоединение триэтилортопропионата к аллиловым спиртам в условиях перегруппировки Кляйзена привело к смеси диастереомерных эфиров **22**, содержащих  $24\alpha$ -метильную группу и транс- $\Delta^{22}$ -связь. Трансформация сложноэфирной группы в метильную осуществлена последовательностью реакций восстановления, тозилрования и восстановления тозилата. Олефин **24**, полученный в результате трансформаций, использовали для дальнейшего построения боковой цепи кампестерина, которое заключалось в гидрировании над оксидом платины (IV) до соединения **25**. Следует отметить, что использование в качестве катализатора палладия на сульфате бария или свежеприготовленного никеля Реня (W-6) приводит к смеси неразделимых изомеров соединения **25**, вследствие изомеризации двойных связей (Рисунок 2.4). Относительная склонность к миграции двойной связи соответствует способности катализаторов адсорбировать водород. Обработкой TsOH соединения **25** получен кампестерин **26** с выходом 37% в расчете на альдегид **5**. В ПМР-спектре кампестерина присутствует мультиплет

$3\alpha$ -протона с  $\delta$  3.55 м.д. и синглет олефиного протона при  $C^6$  с  $\delta$  5.35 м.д. Спектральные данные полученного кампестерина идентичны литературным [213].

### 2.2.2. Синтез brassinоида

Удобным интермедиатом в синтезе brassinоида является олефин **24**, содержащий  $24\alpha$ -метильную группу и двойную связь в боковой цепи, необходимую для введения диольной группы. Обработкой толуолсульфокислотой олефина **24** получен криностерин **27** (Схема 2.5). В ПМР-спектре криностерина **27** присутствует типичный мультиплет  $3\alpha$ -протона с  $\delta$  3.52 м.д. [210, 211, 214], а также два мультиплета олефиновых протонов боковой цепи и циклической части с  $\delta$  5.06-5.12 м.д. и  $\delta$  5.16-5.20 м.д., соответственно. Дальнейший синтез заключается в последовательном тозилровании, изо-стероидой перегруппировке полученного тозилата и окислении циклоспирта в енон **28** для введения кетогруппы в шестое положение. Кипячением енона **28** в диметилформамиде с пиридиный бромидом получен диенон **29**. В ПМР-спектре диенона **29** присутствуют двухпротонные мультиплеты олефиновых протонов боковой цепи и циклической части при  $\delta$  5.12-5.22 м.д. и  $\delta$  5.50-5.76 м.д., соответственно.

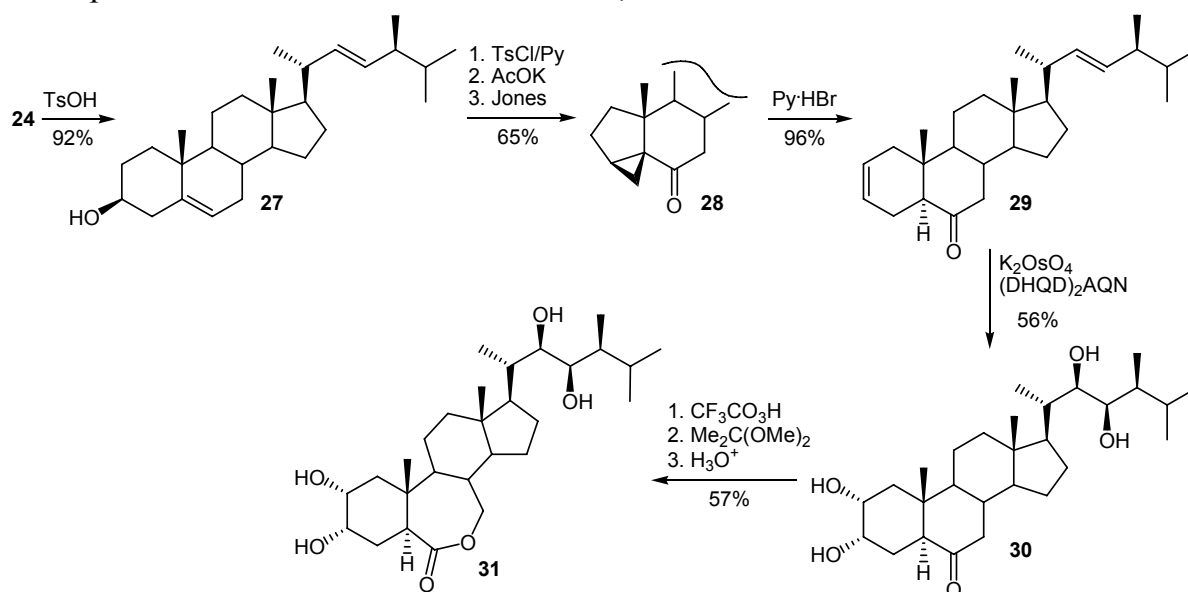
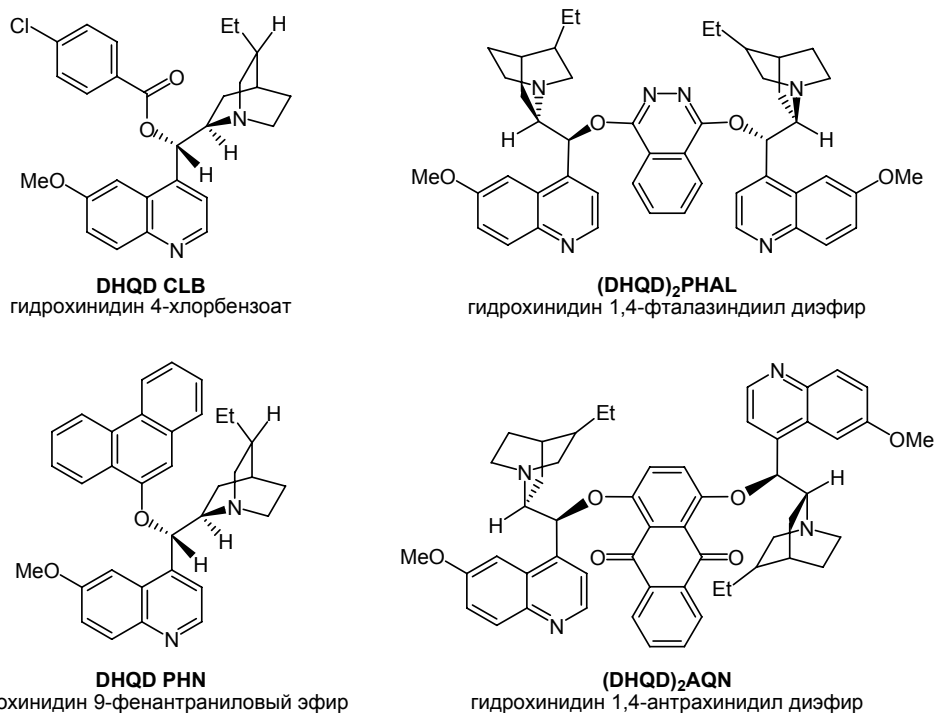


Схема 2.5

Для трансформации олефина в цис-диол, как правило, используют два метода гидроксилирования: по Криге (четыреокись осмия) и по Вудварду (ацетат серебра, йод), взаимно дополняющих друг друга: в первом случае образуются стерически менее затрудненные диолы, во втором - более затрудненные. Гидроксилирование  $\Delta^2$ -связи по Вудварду приводит к основному  $2\beta,3\beta$ -продукту, а использование четырехокиси осмия - к  $2\alpha,3\alpha$ -продукту, соответствующему природным brassinостероидам. Основной продукт гидроксилирования  $\Delta^2$ -связи и по Криге и по Вудварду является *S,S*-диол, неприродный изомер, в то время как *R,R*-диол присутствует в минорных количествах. Использование хиральных

соединений (DHQD CLB, (DHQD)<sub>2</sub>PHAL, DHQD PHN (Рисунок 2.5)) с четырехокисью осмия (гидроксирирование по Шарплесу) позволяет увеличить выход *R,R*-диола. Стереоселективность гидроксирирования по Шарплесу  $\Delta^{22}$ -стероидов зависит от заместителя в 24 положении, но, в большей степени, определяется жесткой циклической частью стероида, которая затрудняет подход комплекса оксида осмия с хиральным лигандом. В результате, продукт гидроксирирования представляет смесь изомеров при использовании различных катализаторов [215-220]. В результате применения предложенного нами катализатора (DHQD)<sub>2</sub>AQN (Рисунок 2.5) при гидроксирировании диенона **29** получен целевой *R,R*-диол (кастастерон) **30** с выходом до 56%. Спектральные данные кастастерона **30** идентичны литературным [217, 218, 220-224].



**Рисунок 2.5** Хиральные лиганды, используемые для гидроксирирования

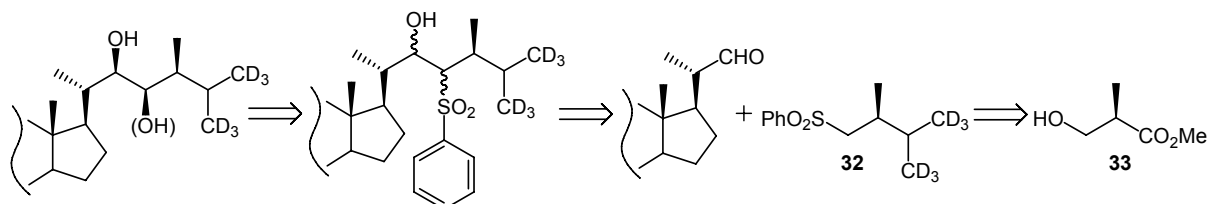
Окисление по Байеру-Виллигеру кастастерона **30** привело к брассинолиду **31**, который был дополнительно подвергнут очистке в виде неполярного диацетонида и затем обратно трансформирован в брассинолид **31** с выходом 18% в расчете на олефин **24**. Структура брассинолида подтверждена спектральными данными, которые идентичны литературным [218, 221, 222, 225-227].

### Выводы

Изучены новые аспекты гидрирования и гидроксирирования по Шарплесу 24-метил- $\Delta^{22}$ -стероидов, ключевых стадий синтеза стероидов и их метаболитов – брассиностероидов. Разработаны методы масштабируемого синтеза труднодоступных соединений. Осуществлен синтез природных стероидов: кампестерина, криностерина, кастастерона, брассинолида [228-233].

### 2.3. Синтез дейтерированных стероидов

Биоактивные соединения широко используются в различных областях практики. Брассиностероиды являются одним из перспективных классов биоактивных соединений. Изучение их биосинтеза и метаболизма является важнейшей задачей наряду с поиском новых соединений этого ряда, химическим синтезом, изучением свойств и аспектов практического применения [141, 186]. Предпочтительная возможность изучения биосинтеза брассиностероидов связана с использованием предварительно синтезированных изотопномеченных соединений. Один из наиболее удобных вариантов метки представляет изотоп водорода – дейтерий. Атомы дейтерия должны содержаться в положениях молекулы, исключающих дейтерообмен в условиях функционирования биосистемы, и в количестве, позволяющем дифференцировать меченые соединения от сопутствующих природных спутников, т.е. синтезированные соединения должны содержать три или более атомов дейтерия.



**Рисунок 2.6** Ретросинтетическая схема построения боковой цепи дейтерированных стероидов

Мы полагали, что наиболее подходящим синтоном боковой цепи для получения дейтерированных брассиностероидов может служить сульфон **32** (Рисунок 2.6), который может быть синтезирован из коммерчески доступного оптически активного гидроксиэфира **33**. Присоединение сульфона **32** к различным С<sup>22</sup>-альдегидам позволит с минимальным количеством стадий получить требуемую функциональность в циклической части молекулы брассиностероидов.

#### 2.3.1. Формирование боковой цепи дейтерированных стероидов

Синтез боковой цепи включает введение дейтерия в интермедиат, полученный из оптически активного гидроксиэфира **33**, и последующую трансформацию дейтерированного продукта в сульфон **32**.

Тозилат **34** получен последовательностью реакций защиты гидроксильной группы гидроксиэфира **33**, восстановления эфирной группы до спирта и тозилирования полученного продукта (Схема 2.6). Нуклеофильное замещение тиофенолятом натрия и последующее исчерпывающее окисление *m*-хлорнадбензойной кислотой привело к сульфону **35**. В ПМР-спектре сульфона **35** присутствует трехпротонный дублет дублетов метильной группы при хиральном центре с  $\delta$  1.12 м.д. и КССВ 8.5 и 2.5 Гц. В ИК-спектре присутствуют асимметричные колебания сульфогруппы при 1325 см<sup>-1</sup>. В масс-спектре

присутствует пик с  $m/z = 280.1121$  дальтон, соответствующий брутто формуле  $C_{15}H_{20}O_3S [M-H_2O]^+$ . Также интенсивные пики катионов с  $m/z$  85 и 101 дальтон, содержащие тетрагидропиранильный фрагмент  $[THP-H]^+$  и  $[THPO]^+$ , соответственно.

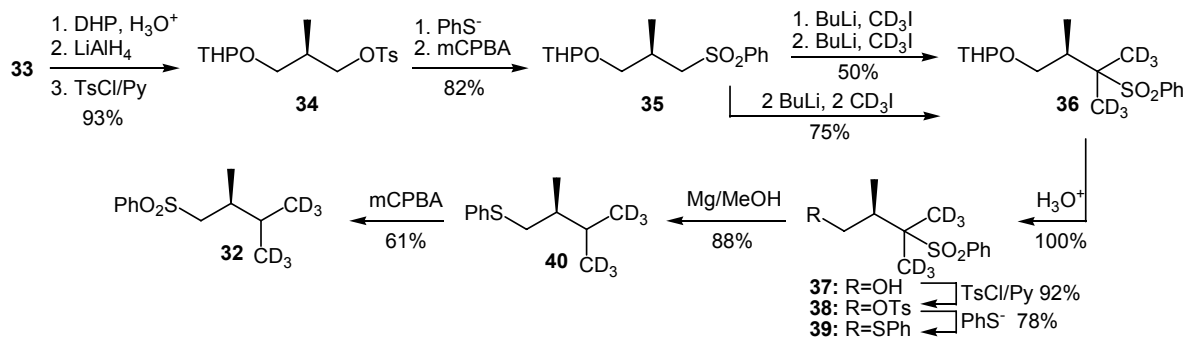


Схема 2.6

Использование последовательного моноалкилирования сульфона **35** при низкой температуре дейтерийодметаном через интермедиаты **35a** и **35b** приводит к образованию целевого продукта **36** с выходом 50% (Схема 2.7) вместе с моноалкилированным сульфеном **35b** и  $\alpha,o$ -диалкилированным сульфеном. В соответствии с литературными данными, избыточное количество бутиллития в условиях алкилирования может приводить к образованию смеси солей: кинетического продукта **35c** и термодинамического продукта **35d** [234, 235]. Характерно, что последний может быть получен термической конверсией первого. Этот подход, однако, оказался неприемлем в нашем случае для осуществления одностадийного процесса диалкилирования [234-236].

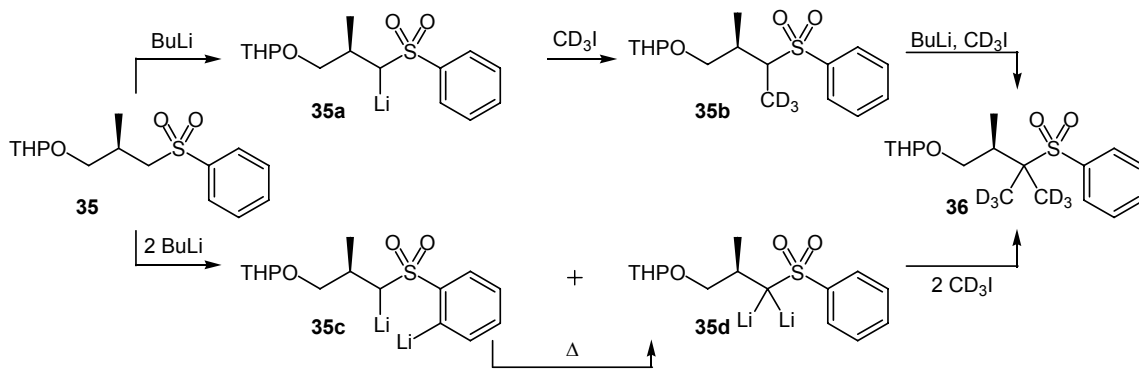


Схема 2.7

В результате тщательного подбора условий были найдены оптимальные, позволяющие получить целевой продукт одностадийного диалкилирования с выходом 75%, при этом образования побочных продуктов (моноалкилирования и/или  $\alpha,o$ -диалкилирования) не было отмечено. В ПМР-спектре соединения **36** присутствует дублет дублетов метильной группы с  $\delta$  1.12 м.д. ( $J = 7, 5$  Гц). В ИК-спектре алкилированного продукта **36** сместилась частота асимметричных

колебаний сульфогруппы к  $1305\text{ см}^{-1}$ . В масс-спектре присутствует пик с  $m/z = 247.1275$  дальтон, соответствующий брутто формуле  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{D}_6\text{O}_3\text{S}$   $[\text{M-TMP}]^+$ .

Гидролизом продукта **36** получен спирт **37**. В ПМР-спектре наблюдается два дублета дублетов протонов при гидроксигруппе с  $\delta$  3.71 и 3.98 м.д. и трехпротонный дублет метильной группы. Последовательные реакции тозилрования и нуклеофильного замещения полученного тозилата **38** привели к соединению **39**. В ПМР-спектре присутствует дублет метильной группы при  $\delta$  1.10 м.д. и два характерных дублета дублетов протонов при сульфидной группе с  $\delta$  2.60 ( $J = 13, 11$  Гц) и 3.90 м.д. ( $J = 13, 1.5$  Гц). Селективным восстановлением в мягких условиях из соединения **39** получен сульфид **40**, в ИК-спектре которого отсутствуют характерные колебания сульфогруппы. Окислением м-хлорнадбензойной кислотой сульфида **40** получен дейтерированный сульфон **32**. В ПМР-спектре сульфона **32** присутствует трехпротонный дублет с  $\delta$  1.02 м.д. ( $J = 7$  Гц) метильной группы и два дублета дублетов протонов в  $\alpha$ -положении к сульфогруппе с  $\delta$  2.88 ( $J = 14, 8.5$  Гц) и 3.10 м.д. ( $J = 14, 3.5$  Гц), что согласуется с литературными данными, полученными для недейтерированного сульфона [203]. Таким образом, в результате последовательности 11 реакций получен интермедиат для конвергентного синтеза дейтерированных  $24\alpha$ -метилстероидов, сульфон **32**, с выходом 22% в расчете на гидроксифир **33**.

### 2.3.2. Синтез дейтерированных 23-дезоксибрассиностероидов

Как было отмечено выше (Рисунок 1.6), известно несколько альтернативных путей биосинтеза брассинолида из кампестерина [135, 137, 140-142, 186, 237]. Различие между ними заключается в последовательности введения кислородсодержащих групп. С целью проведения исследования гипотетического пути биосинтеза, заключающегося в “позднем” введении  $23\alpha$ -гидроксигруппы, мы осуществили синтез дейтерированных 23-дезоксибрассиностероидов [238].

В соответствии с предложенной ретросинтетической схемой (Рисунок 2.6), синтез целевых соединений заключался в присоединении дейтерированного сульфона **32** к  $\text{C}^{22}$ -альдегидам и последующей модификацией полученных гидроксисульфонов. Присоединение сульфона **32** к альдегиду **9** привело к смеси гидроксисульфонов **41** (Схема 2.8). Последующим окислением по Сверну получены кетосульфоны **42**. Наиболее удобным вариантом синтеза кетосульфонов **42** могло оказаться присоединение сульфона **32** к стероидному  $\text{C}^{22}$ -эфиру **7**. Несмотря на то, что данная реакция широко используется в органическом синтезе, в литературе присутствует единственный пример присоединения алкилфенилсульфона к стероидному  $\text{C}^{22}$ -эфиру [239]. Попытки осуществить аналогичный подход в нашем случае оказались неудачными.



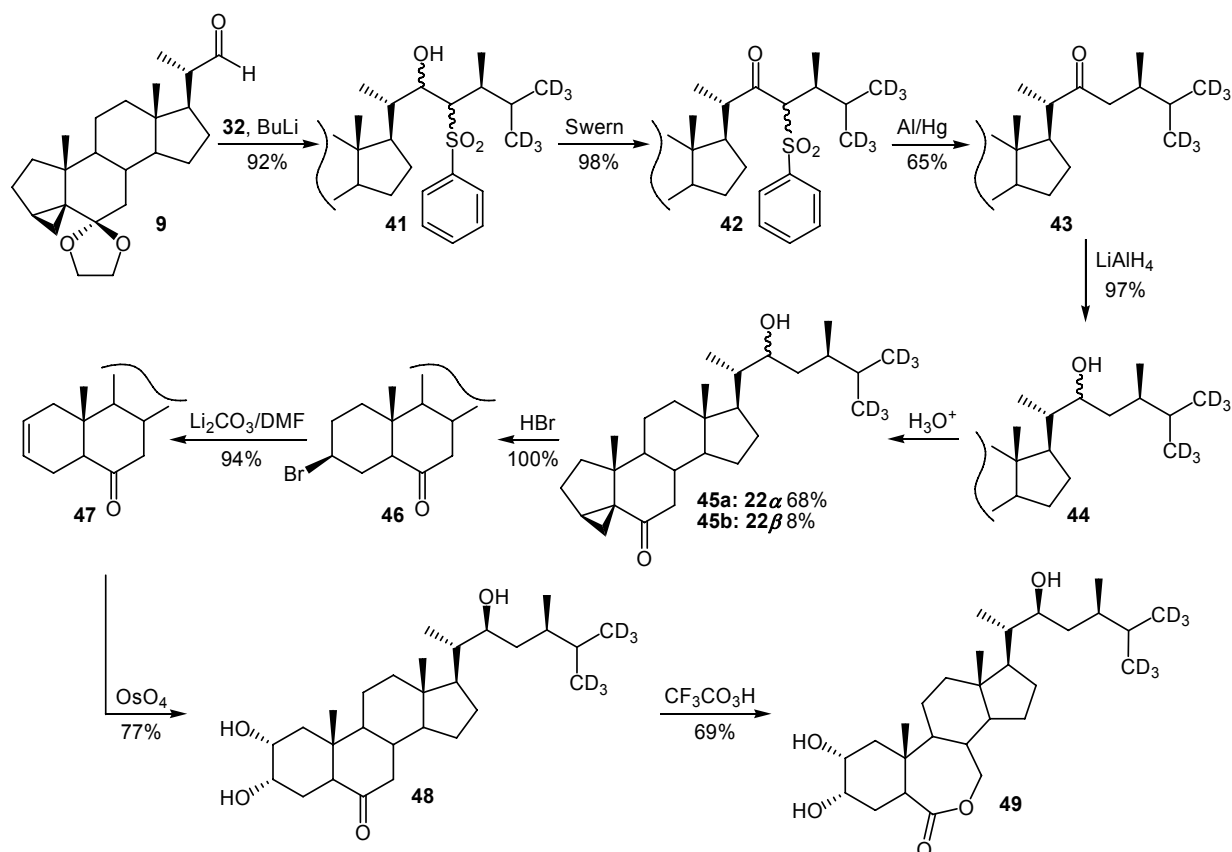


Схема 2.8

Дальнейшие превращения заключались в последовательности реакций десульфирования, восстановления полученного кетона и снятия защитной группы. В соответствии с правилом Крама, гидридное восстановление 22-кетостероидов приводит к предпочтительному образованию 22 $\alpha$ -гидроксистероида типа **45a**. В ПМР-спектре спирта **45a** присутствует триплет C<sup>22</sup>-протона с  $\delta$  3.78 м.д. с КССВ равной 6.7 Гц, а в спектре спирта **45b** мультиплет с  $\delta$  3.71-3.77 м.д. Полученный спирт **45a** содержит сформированную боковую цепь 23-дезоксикастастероидов, и дальнейшие усилия были направлены на функционализацию циклической части. Обработкой спирта **45a** бромоводородом получен кетобромид **46**, в ПМР-спектре которого появился мультиплет 3 $\alpha$ -протона с  $\delta$  3.89-3.99 м.д. Кипячение кетобромиды **46** в диметилформамиде в присутствии карбоната лития привело к енону **47**. Последующим гидрокселированием тетраоксидом осмия получен [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]23-дезоксикастастерон **48** с выходом 28% в расчете на сульфон **32**. В ПМР-спектре **48** присутствует дублет дублета 5 $\alpha$ -протона с  $\delta$  2.69 м.д. ( $J = 12.4, 2.9$ ) и мультиплеты протонов с  $\delta$  3.73-3.80 м.д. (2H, C<sup>22</sup>- и C<sup>2</sup>-H) и  $\delta$  4.05 (1H, C<sup>3</sup>-H). Брутто формула, полученная по результатам ВРМС для пика молекулярного иона, соответствует [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]23-дезоксикастастерону **48** (C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>D<sub>6</sub>O<sub>4</sub>). Окислением по Байеру-Виллигеру 23-дезоксикастастерона **48** получен [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]23-дезоксикастастероид **49** с выходом 19% в расчете на сульфон **32**. В ПМР-спектре заметно смещение дублета дублетов 5 $\alpha$ -протона в слабое поле ( $\delta$  3.14 м.д.) и

добавился двухпротонный мультиплет с  $\delta$  3.99-4.11 м.д. протонов при  $C^7$ . В  $^{13}C$  ЯМР-спектре сигнал  $C^6$ -углерода сместился в сильное поле ( $\delta$  176.46 м.д.).

Синтез других представителей 23-дезоксиграссиностероидов основывался на трансформации полученного спирта **45a**. Взаимодействием уксусного ангидрида со спиртом **45a** получен ацетат **50** (Схема 2.9). Последующее раскрытие циклопропанового цикла уксусной кислотой привело к диацетату **51**. В его ПМР-спектре мультиплеты протонов при  $C^3$  и  $C^{22}$  находятся при  $\delta$  4.66 и 4.98–5.12 м.д., соответственно. Омылением диацетата **51** получен [26,27- $^2H_6$ ]катастерон **53** с выходом 20% в расчете на сульфон **32**. Мультиплеты протонов  $C^3$  и  $C^{22}$  в ПМР-спектре находятся при  $\delta$  3.62 и 3.72–3.86 м.д., соответственно. Полученные спектральные данные для дейтерированного катастерона **53** согласуются с литературными для природного соединения [201, 240].

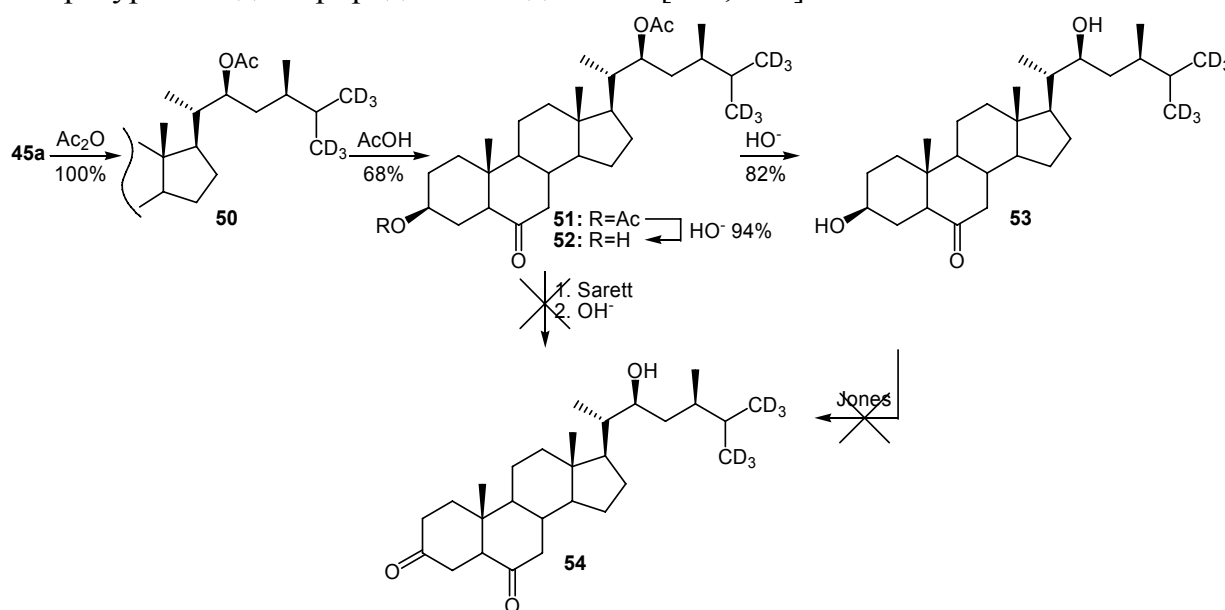


Схема 2.9

Омыление ацетильной защиты, следующее за окислением моноацетата **52** по Саретту, не привело к желаемому 3-дегидрокатастерону **54**, вследствие лабильности 3,6-дикетосоединений в условиях гидролиза. Также не увенчалась успехом попытка селективного окисления более реакционной 3-гидроксигруппы катастерона **53** реактивом Джонса. Последующий синтез 3-дегидрокатастерона **54** основывался на использовании  $C^{22}$ -альдегида **15**, содержащего защищенную 3,6-дикетофункцию (Схема 2.10). По схеме, использованной при синтезе спиртов **44** из альдегида **9** получили спирт **58**. Последующим снятием диоксолановой защиты получен целевой дейтерированный 3-дегидрокатастерон **54** с выходом 33% в расчете на сульфон **32**. В ПМР-спектре сигнал протона при  $C^{22}$  присутствует в виде дублета триплетов при  $\delta$  3.77 м.д. с КССВ 6.6 и 0.7 Гц. В  $^{13}C$  ЯМР-спектре сигналы  $C^3$ - и  $C^6$ -атомов находятся при  $\delta$  209.10 и 211.26 м.д.

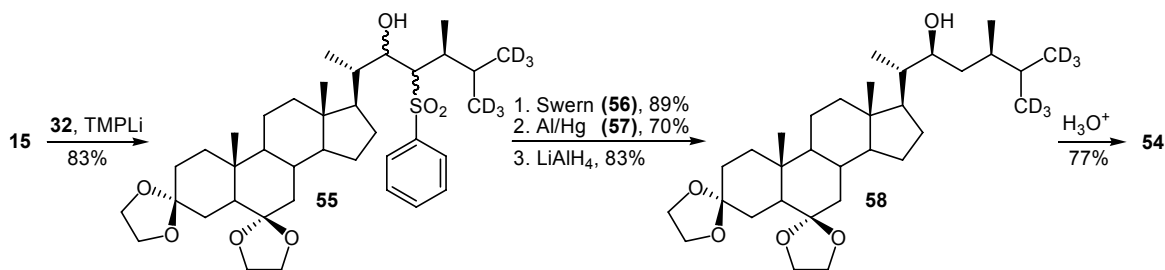


Схема 2.10

### 2.3.3. Синтез дейтерированных оксистеринов

Недавно открытый альтернативный путь биосинтеза brassinостероидов из кампестерина – “раннее” C<sup>22</sup>-окисление, заключающееся в первоначальном введении 22 $\alpha$ -гидроксигруппы и последующем формировании циклической части молекулы (Рисунок 1.6) [148, 237]. Установление взаимосвязи между альтернативными путями важно для понимания и регулирования биосинтеза brassinостероидов. Как один из этапов решения этой задачи нами был осуществлен синтез дейтерированных оксистеринов – предполагаемых участников гипотетической схемы биосинтеза brassinостероидов.

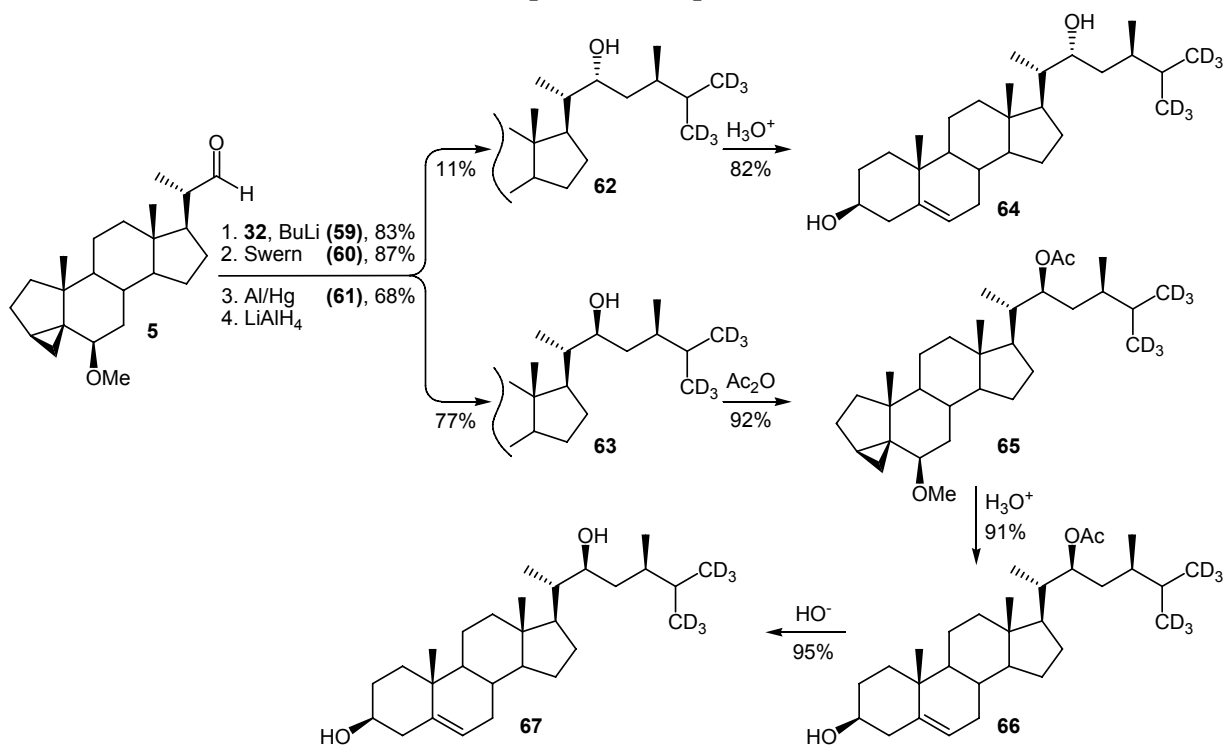


Схема 2.11

В соответствии с предложенной ретросинтетической схемой (Рисунок 2.6) удобным интермедиатом для синтеза целевых соединений является C<sup>22</sup>-альдегид **5**, содержащий защищенную циклическую функциональность стерина. С использованием последовательности реакций, аналогичной вышеописанному превращению альдегида **9** в спирты **44**, получены спирты **62** и **63** (Схема 2.11). В их

ПМР-спектрах отмечено заметное различие сигналов протонов при  $C^{22}$ . Так, соответствующий сигнал  $22\beta$ -спирта **62** представлен в виде дублета дублетов ( $J = 11, 3, 1.2$  Гц) при  $\delta$  3.74 м.д., а в  $22\alpha$ -спирте **63** – триплет при  $\delta$  3.77 м.д. ( $J = 6.6$  Гц), что согласуется с литературными данными [201]. Раскрытием циклопропанового цикла спирта **62** получен аналог природного стероида –  $[26,27-^2H_6]22R$ -гидроксикампестерин **64** [241]. Защитой гидроксильной группы спирта **63** и последующей трансформацией циклической части получен гидроксиацетат **66**. В его ПМР-спектре присутствуют мультиплеты протонов при  $C^3$ ,  $C^{22}$  и  $C^6$  с  $\delta$  3.53, 5.01 и 5.35 м.д., соответственно. Омылением гидроксиацетата **66** получен  $[26,27-^2H_6]22S$ -гидроксикампестерин **67** с выходом 30% в расчете на сульфон **32**.  $22S$ -Гидроксикампестерин **67** – промежуточное соединение при биосинтезе brassinolida из кампестерина через  $C_{22}$ -“раннее” гидроксирование [148]. В ПМР-спектре сигнал  $C^{22}$ -протона сместился в сильное поле ( $\delta$  3.77 м.д.) с КССВ равной 6.6 Гц.

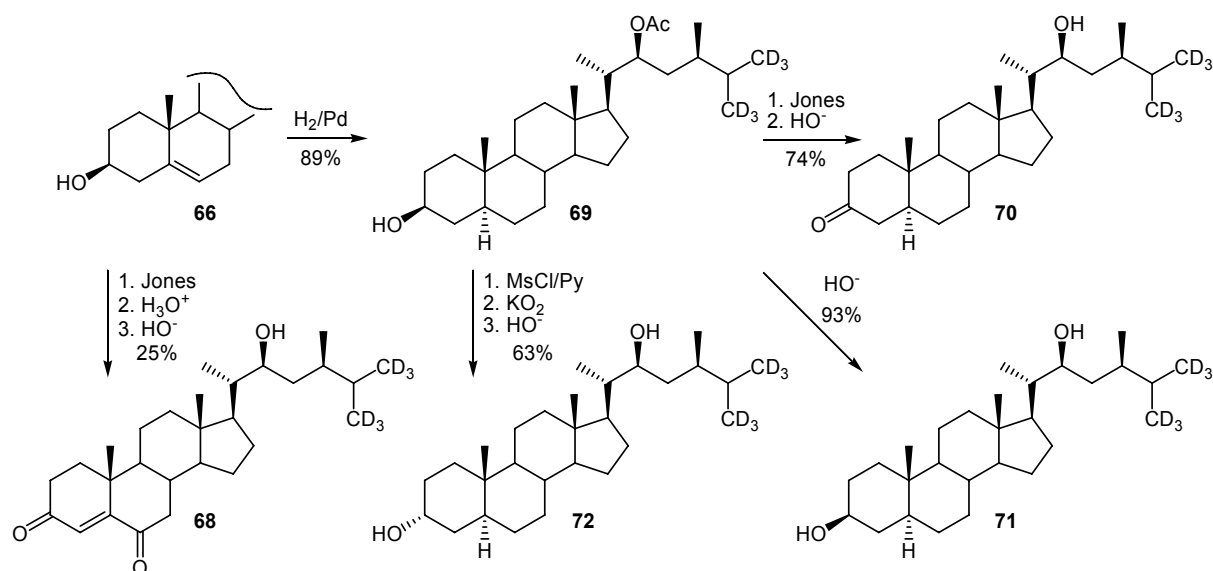


Схема 2.12

Гидроксиацетат **66** был также использован нами для синтеза других дейтерированных аналогов природных  $22\alpha$ -гидроксистероинов (Схема 2.12). Окислением по Джонсу, обработкой кислотой и последующим омылением ацетатной защиты получен гидроксидион **68**, с выходом 8% в расчете на сульфон **32**. В ПМР-спектре этого соединения присутствует сигнал  $C^{22}$ -протона в виде триплета с  $\delta$  3.77 м.д. ( $J = 7.3$  Гц) и характеристичный дублет олефинового  $C^4$ -протона при  $\delta$  6.17 м.д. ( $J = 0.8$  Гц) [197]. В  $^{13}C$  ЯМР-спектре, кроме олефиновых сигналов ( $\delta$  125.50 и 161.00 м.д.), присутствуют сигналы кетогрупп ( $\delta$  199.46 и 202.27 м.д.). Брутто формула, полученная по результатам ВРМС для пика молекулярного иона, соответствует гидроксидиону **68**.

Гидрированием гидроксиацетата **66** над палладием получено соединение **69**, образование  $5\beta$ -изомера не отмечено. Последующее окисление реактивом Джонса

гидроксильной группы и гидролиз ацетатной группы привели к дейтерированному аналогу **70** природного гидроксикетона [148] с выходом 21% в расчете на сульфон **32**. В ПМР-спектре присутствует сигнал  $C^{22}$ -протона с  $\delta$  3.77 м.д. ( $J = 7$  Гц). В  $^{13}C$  ЯМР-спектре присутствует сигнал кетогруппы при  $\delta$  212.17 м.д. Омылением соединения **69** получен  $[26,27-^2H_6]3\beta,22S$ -гидроксикампестанол **71** с выходом 26% в расчете на сульфон **32**. В ПМР-спектре **71** присутствует триплет  $C^{22}$ -протона с  $\delta$  3.77 м.д. с КССВ, равной 6.6 Гц и мультиплет  $C^3$ -протона с  $\delta$  3.59 м.д.  $3\beta,22S$ -гидроксикампестанол был обнаружен в *Catharanthus roseus*, *Arabidopsis thaliana* и является биопредшественником брассинолида [148, 155]. Мезилированием соединения **69**, последующей реакцией нуклеофильного замещения мезильной группы и снятием ацетатной защиты получен дейтероаналог другого природного соединения [148, 155]  $[26,27-^2H_6]3\alpha,22S$ -гидроксикампестанол **72** с выходом 18% в расчете на сульфон **32**. Существенное различие между соединениями **71** и **72** наблюдается в химических сдвигах сигнала  $C^3$ -протонов в ПМР-спектрах, равных  $\delta$  3.59 и 4.04 м.д. ( $W/2 = 7$  Гц) соответственно, что согласуется с литературными данными для недейтерированного соединения [155]. В  $^{13}C$  ЯМР-спектрах соединений **71** и **72** также наблюдается разница в химических сдвигах сигналов  $C^3$ -атомов, отвечающих  $\delta$  71.34 и 70.64 м.д. соответственно.

#### 2.3.4. Синтез (22R,23R)-диоксипроизводных

Проведение эксперимента по установлению механизма биосинтеза брассиностероидов подразумевает использование дейтерированных производных в качестве внутреннего стандарта качественного и количественного анализа соответствующих метаболитов в растительном материале. Кроме того, при проведении биосинтетических экспериментов исследователь может столкнуться с необходимостью синтеза гипотетических соединений, которые могут быть вовлечены в биосинтез исследуемого вещества. Поэтому синтез дейтерированных брассиностероидов должен включать получение производных, которые могут быть трансформированы в требуемые меченые соединения.

Описанные выше продукты присоединения сульфона **32** к альдегидам – гидроксисульфоны – содержат сформированный углеродный скелет и могут быть превращены в  $\Delta^{22}$ -стероиды – ключевые интермедиаты синтеза 22,23-диолов, в том числе принадлежащих известным структурным типам брассиностероидов, а также гипотетических участников процесса биосинтеза.

Восстановлением амальгамой натрия ацетоксисульфона **73**, полученного из гидроксисульфона **41**, синтезирован олефин **74** (Схема 2.13). В ПМР-спектре полученного продукта присутствует характерный мультиплет транс-олефиновых протонов ( $\delta$  5.17 м.д.). Гидроксилирование олефина **74** смесью AD-mix  $\beta$  привело к образованию диолов **75** и **76**. Конфигурация  $C^{22}$ - и  $C^{23}$ -центров этих соединений была приписана на основании сравнительного анализа их спектральных данных и

соединений с аналогичными боковыми цепями, описанных в работах [215, 220]. В ПМР-спектрах диолов **75** и **76** сигналы  $C^{22}$ - и  $C^{23}$ -протонов присутствуют в виде дублетов при  $\delta$  3.45 и 3.68 м. д. и с  $\delta$  3.56 и 3.71 м. д., соответственно (Рисунок 2.7). В  $^{13}C$  ЯМР-спектрах диолов **75** и **76** сигналы  $C^{22}$ - и  $C^{23}$ -атомов находятся при  $\delta$  71.18 и 71.57 м. д. (**75**) и при  $\delta$  73.47 и 74.87 м. д. (**76**). Смещение указанных сигналов в слабое поле для *R,R*-диола **76** по сравнению с его *S,S*-изомером **75** характерно для  $24\alpha$ -алкилстероидов [215, 220].

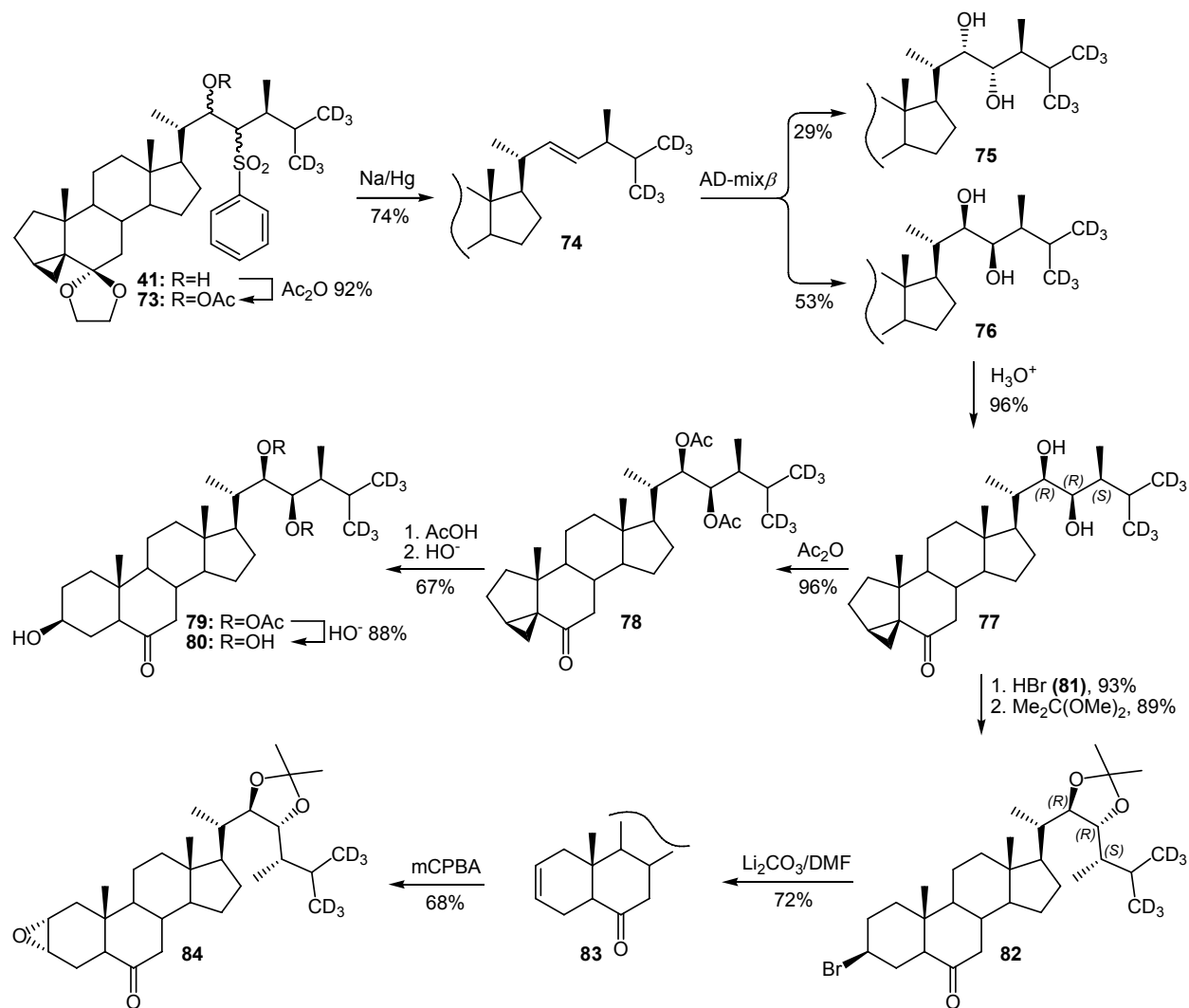
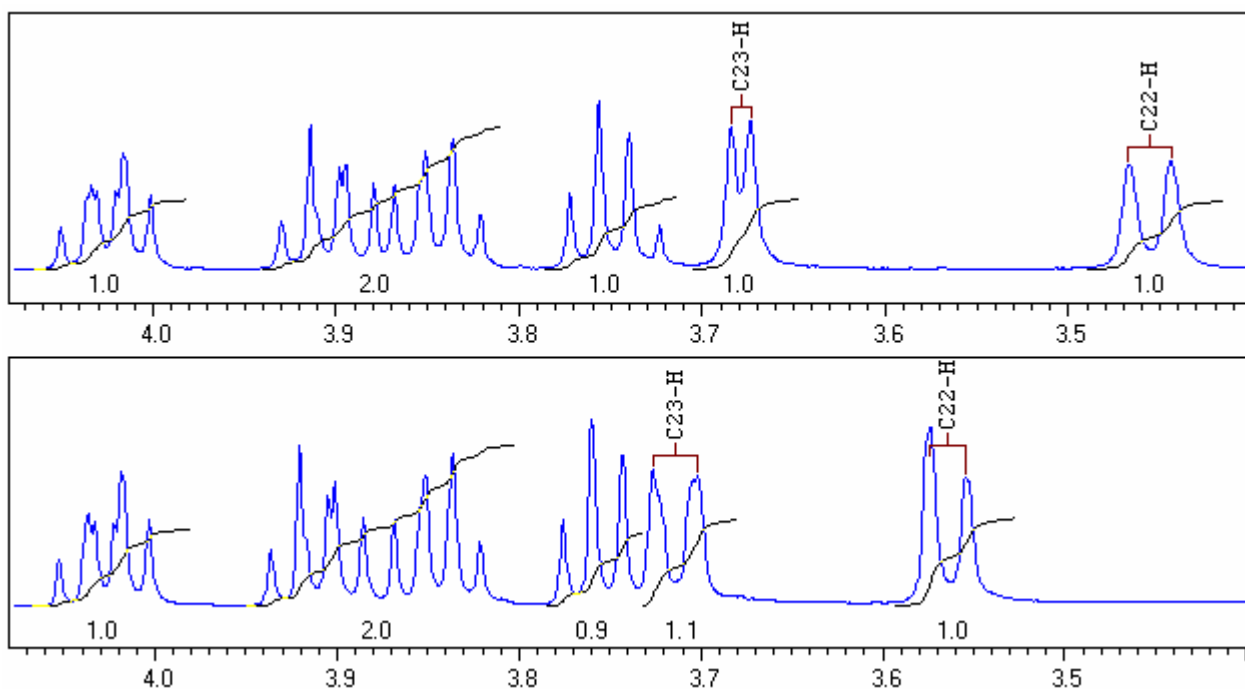


Схема 2.13

Снятием диоксолановой защиты соединения **76** получен кетодиол **77**, который содержит полностью сформированную боковую цепь и легко может быть трансформирован в целевые брассиностероиды. Защитой гидроксильных групп получен диацетат **78**, который затем был трансформирован в  $[26,27-^2H_6]$ теастерон **80** в результате реакций раскрытия циклопропанового цикла и снятия ацетатных защитных групп. Выход  $[26,27-^2H_6]$ теастерона **80** составил 20% в расчете на гидроксисульфон **41**. Спектральные данные  $[26,27-^2H_6]$ теастерона **80** согласуются с приведенными в литературе для природного соединения [242-244].



**Рисунок 2.7** Фрагменты ПМР-спектров спиртов **75** (вверху) и **76** (внизу)

Гидробромированием кетодиола **77** получен соответствующий  $3\beta$ -бромдиол **81**. В ПМР-спектре его присутствует характерный для 6-кетосоединений дублет дублета  $7\beta$ -протона при  $\delta$  2.32 м.д. ( $J = 13.2, 4.4$  Гц), а также дублеты  $C^{22}$ - и  $C^{23}$ -протонов с  $\delta$  3.56 и 3.71 м.д. и мультиплет  $3\alpha$ -протона при  $\delta$  3.94 м.д. Защита гидроксильных групп бромдиола **81** и последующее дегидробромирование привело к ацетониду секастерола **83**, обнаруженного нами нового природного brassinosterоида [245]. В ПМР-спектре присутствует характерный симметричный мультиплет олефиновых протонов ( $\delta$  5.55-5.72 м.д.). Эпоксидированием ацетонида секастерола **83** получен ацетонид 2,3-диэписекастерона **84** с выходом 14% в расчете на гидроксисульфон **41**. В ПМР-спектре присутствуют сигналы  $C^2$ - и  $C^3$ -протонов с  $\delta$  3.12 м.д. (дд,  $J = 5.5, 4.0$  Гц,  $C^2$ -H) и 3.26 м.д. (м,  $C^3$ -H), а также дублет дублетов  $C^{22}$ -протона с  $\delta$  3.72 м.д. ( $J = 12.4, 4.4$  Гц) и дублет  $C^{23}$ -протона с  $\delta$  3.82 м.д. ( $J = 8.4$  Гц). Соединения **83** и **84** являются удобными интермедиатами для синтеза различным образом замещенных в циклической части brassinosterоидов [246-249].

Значительный интерес в этой связи представляет также 3,6-дикетон, содержащий защищенную боковую цепь. В качестве исходного соединения для его синтеза был использован гидроксисульфон **55** (Схема 2.14). Применяя методы, аналогичные описанным выше, гидроксисульфон **55** был трансформирован в олефин **85**. Гидроксилирование двойной связи привело к смеси диолов **87**, **88** и дикетона **86**. В ПМР-спектрах диолов **87** и **88** наблюдаются закономерности, аналогичные описанным для диолов **75** и **76** (Рисунок 2.7). Выдерживание диола **88** в ацетоне в присутствии кислоты привело к образованию ацетонида и

одновременному снятию диоксолановой защиты. Полученный ацетонид 3-дегидротеастерона **89** выделен с выходом 23% в расчете на гидроксисульфон **55**. В ПМР-спектре присутствует дублет дублета C<sup>22</sup>-протона при  $\delta$  3.73 м.д. ( $J = 8.4, 4.0$  Гц) и дублет C<sup>23</sup>-протона  $\delta$  3.83 м.д. ( $J = 8.4$  Гц). В <sup>13</sup>C ЯМР-спектре присутствуют сигналы кетогрупп при  $\delta$  209.04 и 211.15 м.д., что согласуется с литературными данными, полученными для нейдетерированного соединения [250].

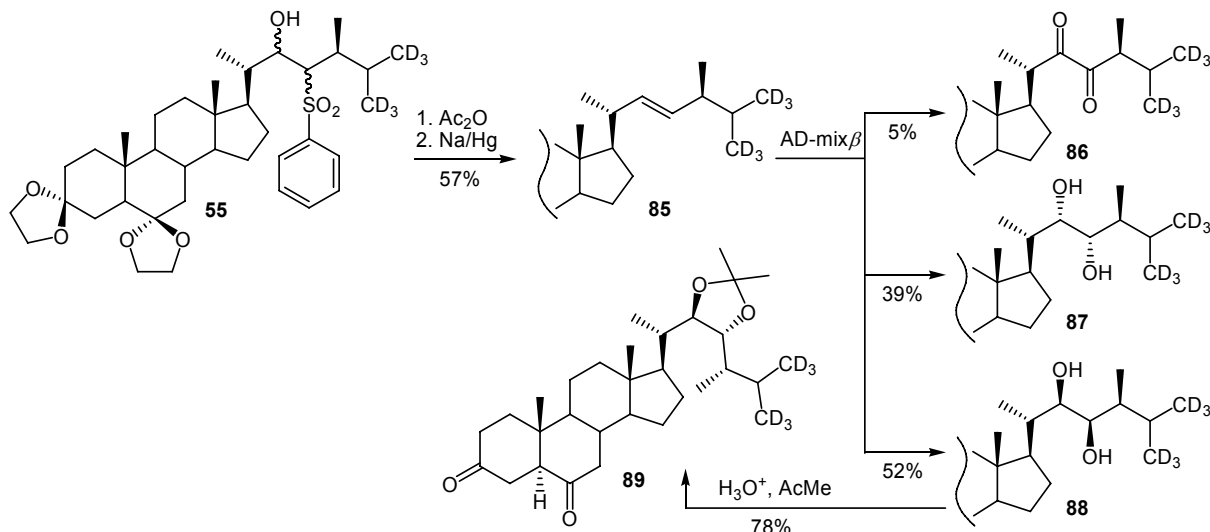


Схема 2.14

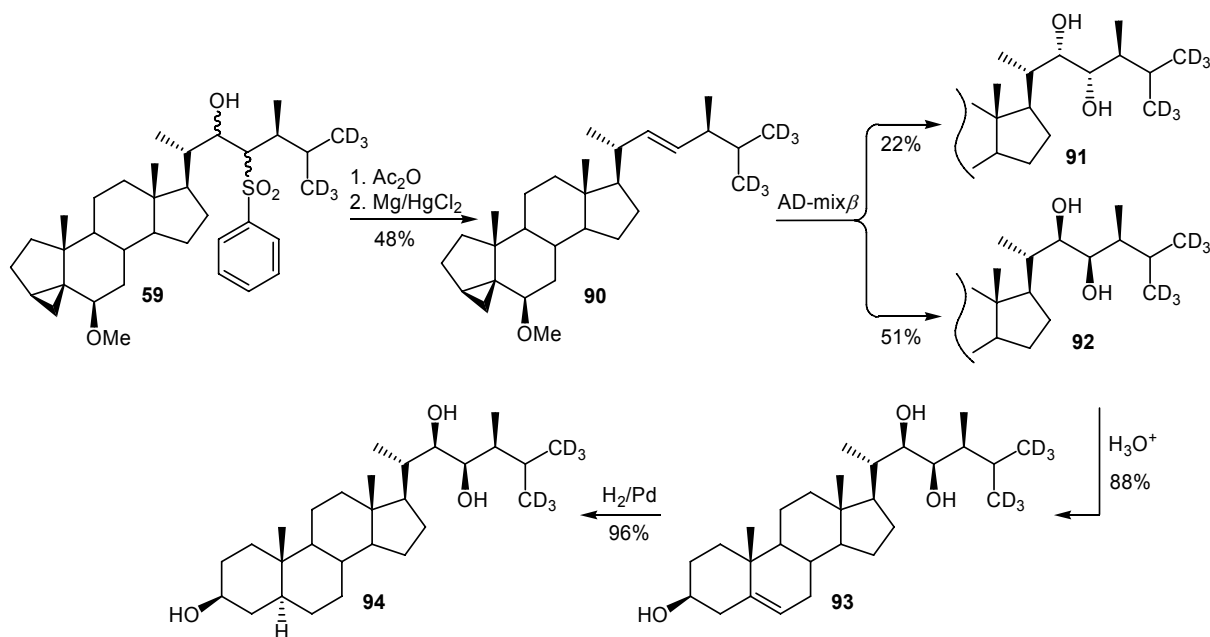


Схема 2.15

Схема биосинтеза brassинолида из кампестанола включает альтернативные пути биосинтеза: “раннее C-6 окисление” и “позднее C-6 окисление”. Биосинтетический путь “позднее C-6 окисление” осуществляется через brassиностероиды, для которых характерно отсутствие 6-кетогруппы [251-253]. Для синтеза данного типа brassиностероидов удобным интермедиатом является гидроксисульфон **59**, описанный ранее (Схема 2.15). Полученный из него



$\beta$ -ацетоксисульфон был восстановлен амальгамой магния, генерируемой *in situ*. Гидроксилирование образовавшегося транс-олефина **90** привело к смеси диолов **91** и **92**. Снятием защиты с диола **92** получили энтриол **93**. В его ПМР-спектре присутствуют: мультиплет  $C^3$ -протона с  $\delta$  3.86 м.д., дублет дублетов  $C^{22}$ -протона с  $\delta$  3.99 м.д. ( $J = 8.4, 1.1$  Гц), мультиплет  $C^{23}$ -протона с  $\delta$  4.14 м.д. и мультиплет олефинового  $C^6$ -протона с  $\delta$  5.40-5.44 м.д. Гидрирование двойной связи энтриола **93** на палладиевом катализаторе привело к образованию 6-дезокситеастерона **94** с выходом 21% в расчете на гидроксисульфон **59**, при этом образование  $5\beta$ -изомера не было отмечено. Спектральные данные  $[26,27\text{-}^2\text{H}_6]$ 6-дезокситеастерона **94**, согласуются с приведенными в литературе для природного соединения [254, 255].

Для исследования биотрансформаций эпоксибрассиностероидов в *Secale cereale* возникла потребность в синтезе соединений, являющихся их возможными биопредшественниками и метаболитами. В качестве исходных соединений были выбраны ранее нами синтезированные дейтерированные соединения [229]. Для синтеза предполагаемого биопредшественника эпоксибрассиностероидов был использован диацетат **95** (Схема 2.16). Омыление ацетатных групп в щелочных условиях привело к целевому эндиолу **96** с выходом 92%. В его ПМР-спектре присутствуют сигналы  $C^{22}$ - и  $C^{23}$ -протонов с  $\delta$  3.56 м.д. (дд,  $J = 1.5, 8.4$  Гц) и с  $\delta$  3.71 м.д. (дм,  $J = 8.4$  Гц) и мультиплеты олефиновых  $C^2$ - и  $C^3$ -протонов с  $\delta$  5.56 и 5.68 м.д., соответственно.

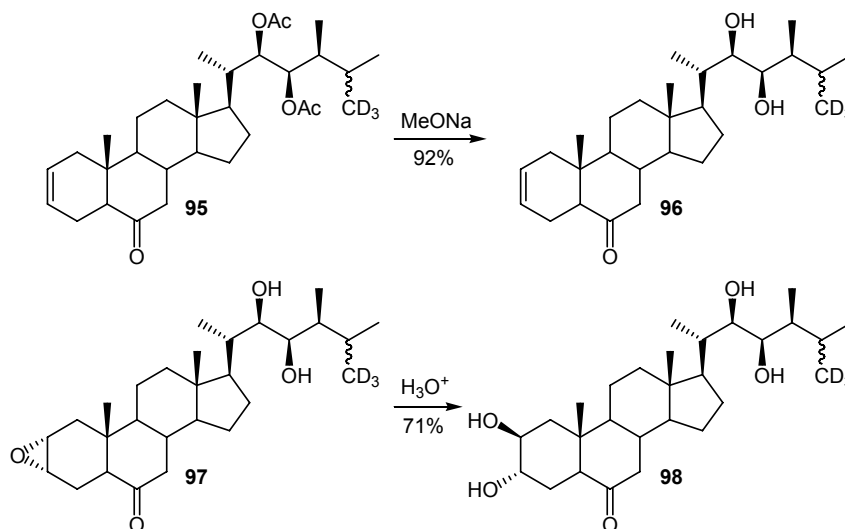


Схема 2.16

Синтез возможного метаболита эпоксибрассиностероидов заключался в транс-диаксиальном раскрытии 2,3-диэписекастерона **97** [229]. В результате раскрытия эпоксида был получен целевой продукт – 2-эпикастастерон **98** с выходом 71%. В соответствии с литературными данными образования  $2\alpha,3\beta$ -изомера не было отмечено [256, 257]. В ПМР-спектре **98** присутствуют дублеты  $C^{22}$ - и  $C^{23}$ -протонов при  $\delta$  3.56 и 3.72 м.д. и мультиплеты  $C^2$ - и  $C^3$ -протонов при  $\delta$  3.93 и 3.98 м.д. Таким образом, использование полученных ранее интермедиатов **95**

и **97** позволило осуществить синтез целевых дейтерированных соединений **96** и **98**, которые впоследствии были использованы в биосинтетических экспериментах.

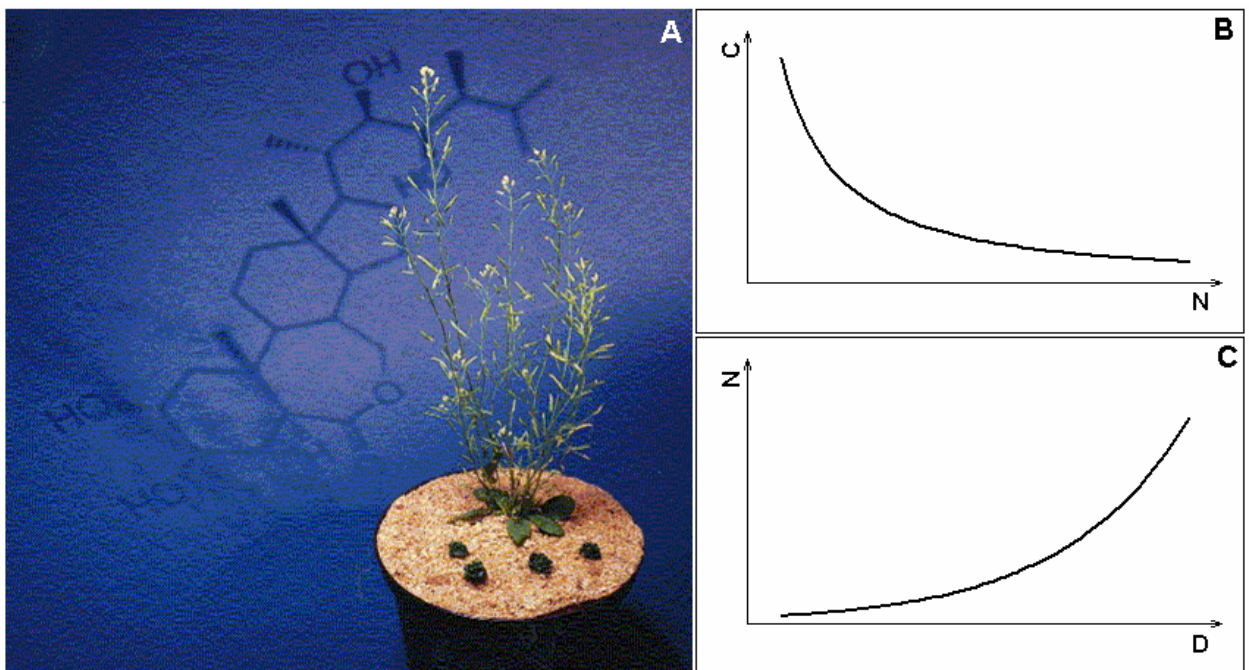
### Выводы

В результате проведенных исследований разработаны новые эффективные методы конвергентного синтеза дейтерированных brassinosterоидов и их предшественников. Осуществлен синтез в общей сложности 15 дейтерированных соединений данного ряда [198, 199, 238, 258], которые являются ценным инструментом при изучении особенностей биосинтеза brassinosterоидов в растениях.

## 2.4. Исследование биосинтеза brassinosterоидов

### 2.4.1. Особенности проведения биосинтетических экспериментов

Одним из важнейших факторов, определяющих интерес к изучению brassinosterоидов, является высокий уровень их биологической активности. Обработка сельскохозяйственных растений экзогенными brassinosterоидами приводит к увеличению урожая и, в ряде случаев, к улучшению его качества, а также повышает устойчивость растений к неблагоприятным факторам [141, 186]. Например, впечатляющий результат морфологического изменения растения получен при обработке *Arabidopsis thaliana cbb3* (мутант с заблокированным  $23\alpha$ -гидроксилированием) brassinosterоидами [259, 260] (Рисунок 2.8 А).



**Рисунок 2.8.** Эффект применения brassinosterоидов (А). Теоретическая зависимость количества соединений  $N$  от их концентрации в растительном экстракте  $C$  (В). Теоретическая зависимость сложности выделения целевого соединения  $D$  от количества соединений в растительном экстракте  $N$  (С).

На рисунке показано пять гомозиготных растений (*cbb3/cbb3*), среди которых одно (на заднем плане) было обработано раствором, содержащим brassиностероиды. Перспективным в плане стимуляции роста и развития также может оказаться использование генетически измененных растений, в которых будет увеличена концентрация эндогенных brassиностероидов [261]. Важным для создания таких культур и целенаправленного воздействия с помощью brassиностероидов на рост и развитие является выяснение деталей биосинтеза соединений данного класса у различных растений.

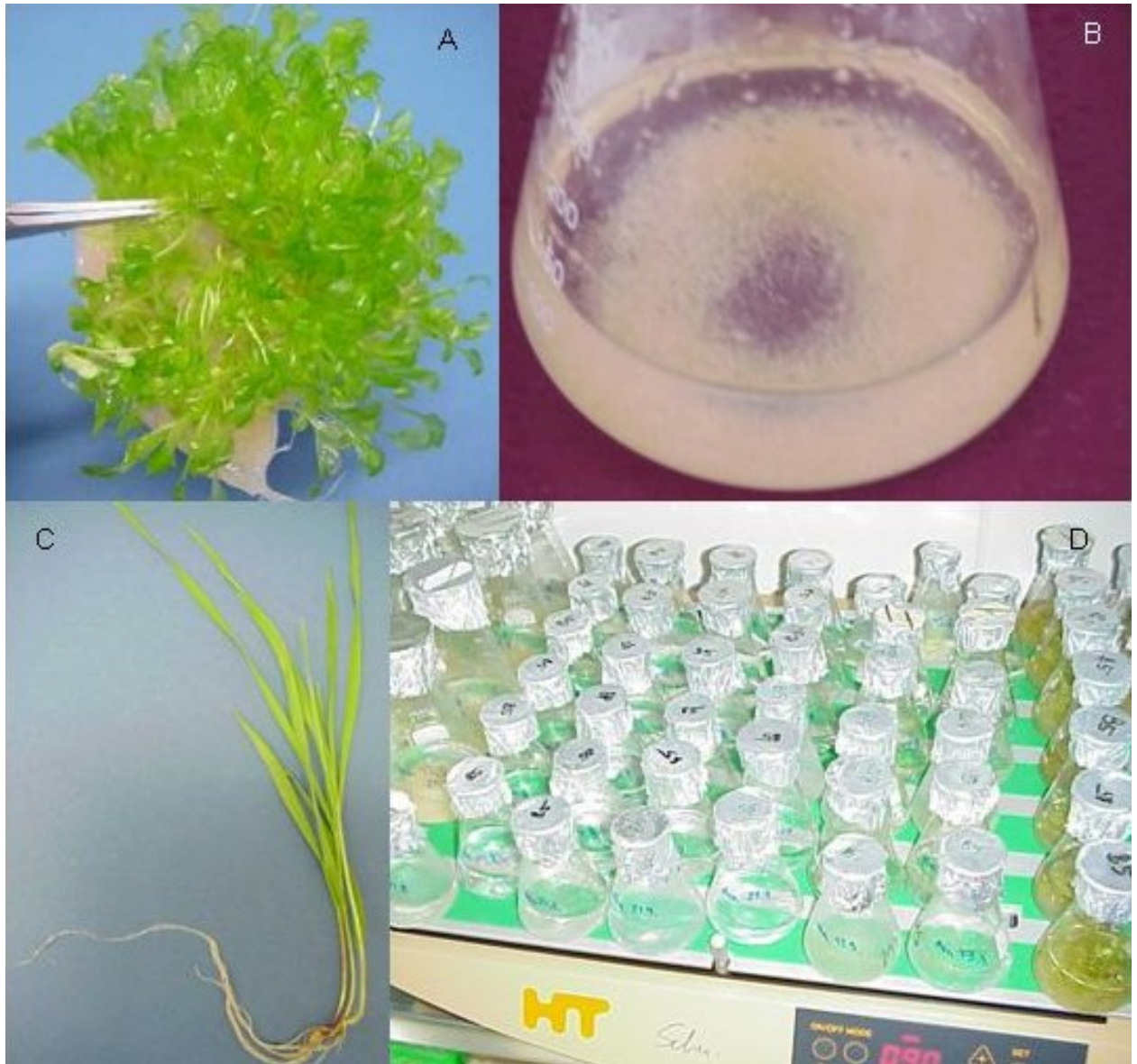
Характерная черта brassиностероидов – высокая биологическая активность при низкой естественной концентрации в растениях (менее 10 нг/г). При данной концентрации ни один из современных аналитических методов не способен идентифицировать их в аликвоте растительного экстракта. Поэтому, первоочередной задачей является поиск эффективного метода выделения исследуемых соединений из растительного материала. Типичный растительный экстракт представляет собой сложную смесь различных по физическим и химическим свойствам соединений. Зависимость их количества от концентрации в растительном экстракте может быть описана кривой распределения [262] (Рисунок 2.8 В). На практике это означает, что число соединений, присутствующих в растительных образцах, в концентрации менее 10 нг/г значительно больше, чем в концентрации более 1 мг/г. Поэтому выделение соединений, присутствующих в низкой концентрации, сопряжено со сложностью очистки их от чрезмерно большого количества различных примесей (Рисунок 2.8 С).

Описанные в литературе способы выделения brassиностероидов основываются на комбинации экстракционных и хроматографических методов [7, 263-265]. Ни один из описанных способов выделения не является универсальным ввиду того, что компонентный состав морфологически разных тканей различается, и разработанные способы, примененные к одной ткани, могут оказаться непригодными для другой. Проблемой разработки новых методов является отсутствие необходимых физических данных для brassиностероидов (коэффициенты экстракции, относительная полярность и др.). Как правило, исследователи основываются на характеристиках родственных соединений (экидистероиды, оксистероиды), что может привести к неадекватным результатам.

#### **2.4.2. Выделение фракции растительного материала, содержащей brassиностероиды**

В качестве объектов исследования были использованы: пророщенный *Arabidopsis thaliana* С24 (резуховидка Таля или резушка Таля), клеточная суспензия *Lycopersicon esculentum* сорта Тамина (томаты) и проростки *Secale cereale* (рожь) сортов Sorom и Petka (Рисунок 2.9).

Биоматериал, приготовленный в соответствии с условиями, описанными в экспериментальной части, использовали для биосинтетических экспериментов. Для этого материал делили на две части, первую часть оставляли без изменений, а ко второй добавляли изучаемый меченный субстрат и инкубировали обе части при условиях выращивания в течение 48÷72 часов. В случае проведения анализа эндогенных brassinosterоидов инкубация исключалась.

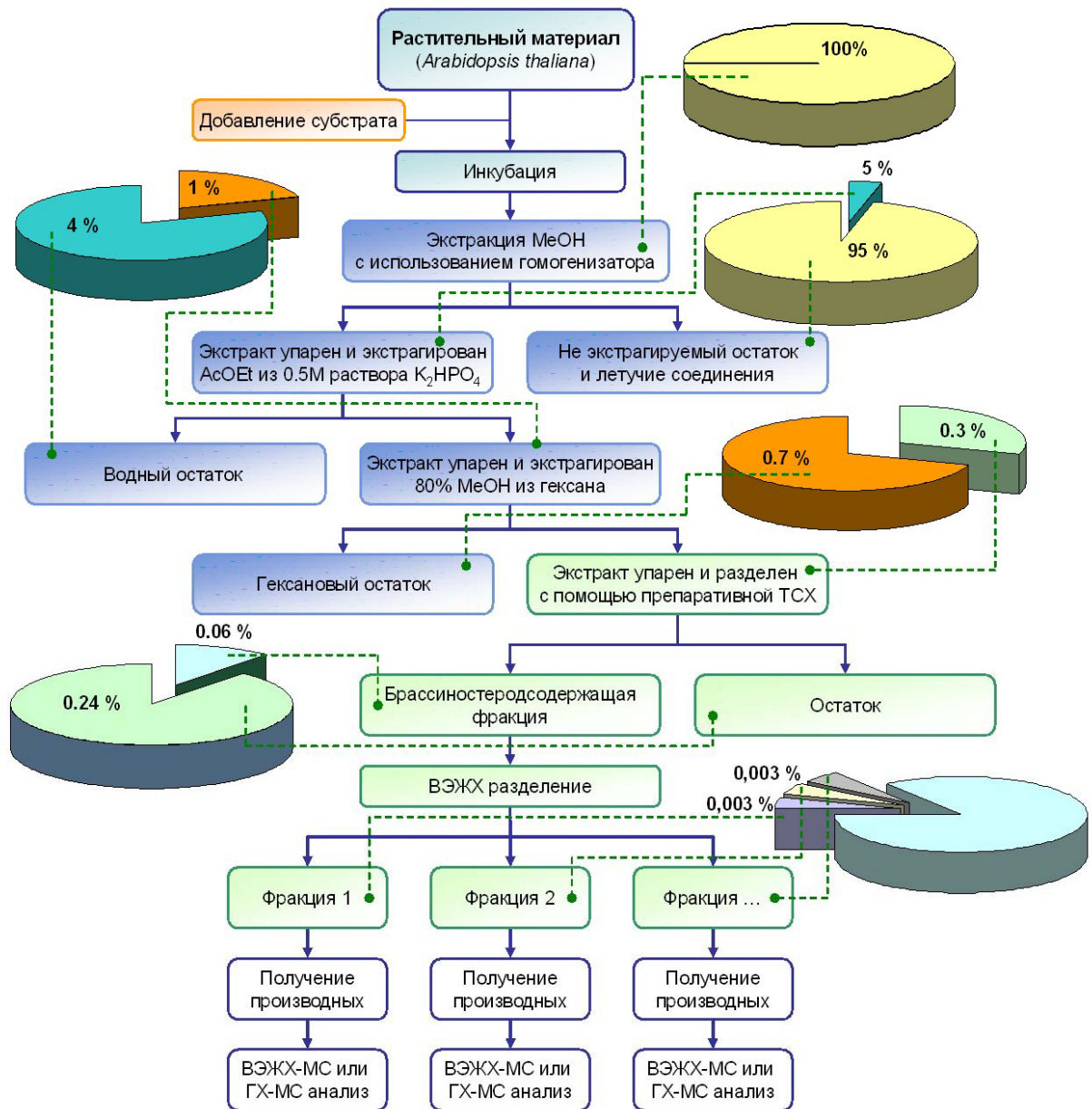


**Рисунок 2.9** *Растительный материал Arabidopsis thaliana C24 (A). Суспендированные клетки томатов Lycopersicon esculentum сорта Tamina (B). Побеги ржи Secale cereale сорта Sorot (C). Приготовление биоматериала для исследований (D).*

По истечении времени инкубации растительный материал был использован для выделения brassinosterоидсодержащей фракции. Разработанный способ включал два этапа: экстракционный и хроматографический (Рисунок 2.10). Первый этап основывался на использовании последовательной экстракции из различных систем. Важным моментом эффективного выделения brassinosterоидсодержащей

фракции являлось попеременное концентрирование целевой фракции растительного материала то в более полярной фазе, то в менее полярной. Второй этап заключался в использовании последовательных хроматографических методов выделения. Основываясь на индексах удерживания стандартов brassinостероидов, выделялись фракции с предполагаемыми метаболитами. Выделенные фракции использовали для идентификации brassinостероидов.

Эффективность выделения brassinостероидсодержащей фракции из *Arabidopsis thaliana*, выполненной с использованием описанного подхода, включавшего 6 шагов концентрирования, впервые в практике анализа brassinостероидов характеризуется высокой степенью извлечения вещества (% recovery), которая составляла в нашем случае  $60 \div 80\%$  [245, 266]!



**Рисунок 2.10** Выделение brassinостероидсодержащей фракции. На диаграммах показана доля выделенной фракции от веса растительного экстракта после каждого этапа выделения.

### 2.4.3. ГХ-МС анализ brassinosterоидов

Наиболее ответственным этапом биосинтетических исследований является анализ метаболитов и идентификация эндогенных соединений. К настоящему времени разработано значительное количество методов анализа brassinosterоидов. ГХ-МС анализ является наиболее распространенным ввиду высокой чувствительности и селективности. Из-за сравнительно высокого молекулярного веса brassinosterоидов, наличия свободных гидроксигрупп и, как следствие, низкой летучести, прямой анализ невозможен и требует предварительного получения более летучих производных. Для связывания циклолильных групп используют МВА и, в случае наличия в молекуле исследуемого вещества транс-диолильных или 3-гидроксильных групп, используют последующее триметилсилилирование [195, 265, 267-271].

К сожалению, практика публикации научных результатов, как правило, не включает негативные. Редко упоминаемым, но существенным недостатком ГХ-МС анализа является необходимость получения летучих производных. Реагенты используемые при этом оказывают разрушительное действие на используемое оборудование [272, 273]. Это связано с модификацией поверхности рабочих частей оборудования, разрушением неподвижной фазы, а также образованием побочных соединений, мешающих анализу. Например, использование МВА приводит к модификации поверхности испарителя, образованию циклических полиангидридов МВА, усложняющих анализ, модификации силиконовой неподвижной фазы и последующему ее разрушению. Визуально это проявляется в уширении пиков анализируемых соединений и изменении их времени удерживания, снижении предела детектирования, появлении гомологичных рядов побочных соединений. Конечный результат – это необходимость частичной замены оборудования при крайне низком сроке службы (20-30 анализов).

С целью уменьшения отрицательного эффекта мы провели изучение путей оптимизации анализа, включавшее:

- поиск реагента для превращения избытка МВА в летучие, стабильные соединения,
- поиск реагентов для регенерации оборудования,
- поиск новых реагентов для получения летучих характеристичных производных brassinosterоидов.

Так, для связывания избытка МВА, остающегося после синтеза эфиров brassinosterоидов, были изучены различные реагенты. Прибавление уксусного и трифторуксусного ангидрида приводило к образованию летучих смешанных ангидридов, которые также обладали вредоносным эффектом. Кроме того, как и триметилсилилирующие реагенты, ангидриды раскрывали эфиры образованные 2,3-гидроксигруппами и МВА (Схема 2.17). При использовании метанола или этиленгликоля наблюдалось образование сложных эфиров МВА, которые не

обладали отрицательным эффектом, но данные спирты практически полностью замещали брассиностероиды в их эфирах с МВА (Схема 2.17).

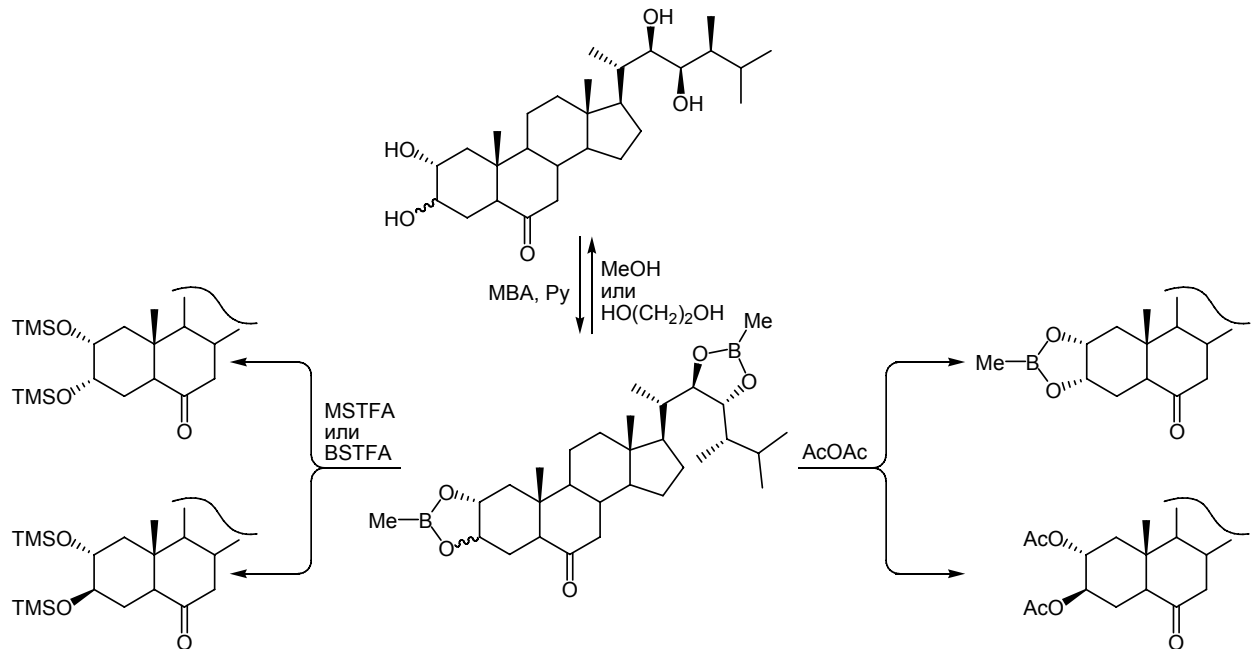


Схема 2.17

Поиск реагентов для регенерации оборудования привел к частичному решению проблемы. Удалось подобрать смеси, которые позволяли частично регенерировать оборудование. Чтобы получить желаемый результат при использовании наиболее эффективной смеси реагентов (метанол, этиленгликоль, триэтиламин = 9:9:2) требовалось не менее 100 раз выдерживать температурный режим, аналогичный использованному для анализа эфиров брассиностероидов. В результате, данный подход оказался малоэффективным.

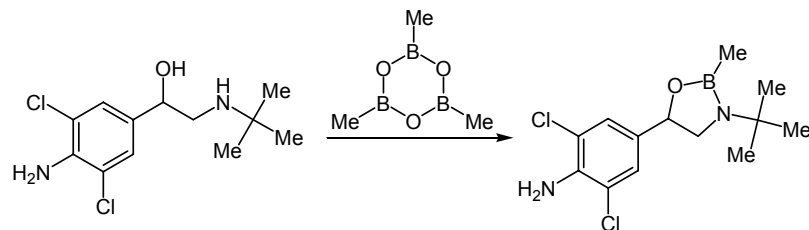


Схема 2.18

В ходе поиска новых возможных путей получения летучих производных брассиностероидов изучали метиловые и триметилсилиловые эфиры брассиностероидов, а также их ацетаты. Как правило, при синтезе данных соединений фиксировались продукты неполной конверсии ввиду различной реакционной способности гидроксигрупп брассиностероидов. Критическим недостатком являлось отсутствие характерной MS-фрагментации полученных соединений, позволяющей отличать дейтерированные соединения от недейтерированных. Использование ацетонидов брассиностероидов оказалось неэффективным ввиду необходимости использования дополнительной стадии

очистки продуктов от катализатора. В результате анализа литературы было предложено использование бороксина (циклический ангидрид МВА). Впервые бороксин был использован на Олимпийских играх в Испании (1992 г) для анализа  $\beta$ -андреноблокаторов (Схема 2.18), но никогда не использовался для модификации диольных групп [273]. Использование бороксина при анализе brassinosteroidов показало сравнительно небольшой отрицательный эффект в отличие от МВА, что позволяло существенно увеличить срок службы оборудования.

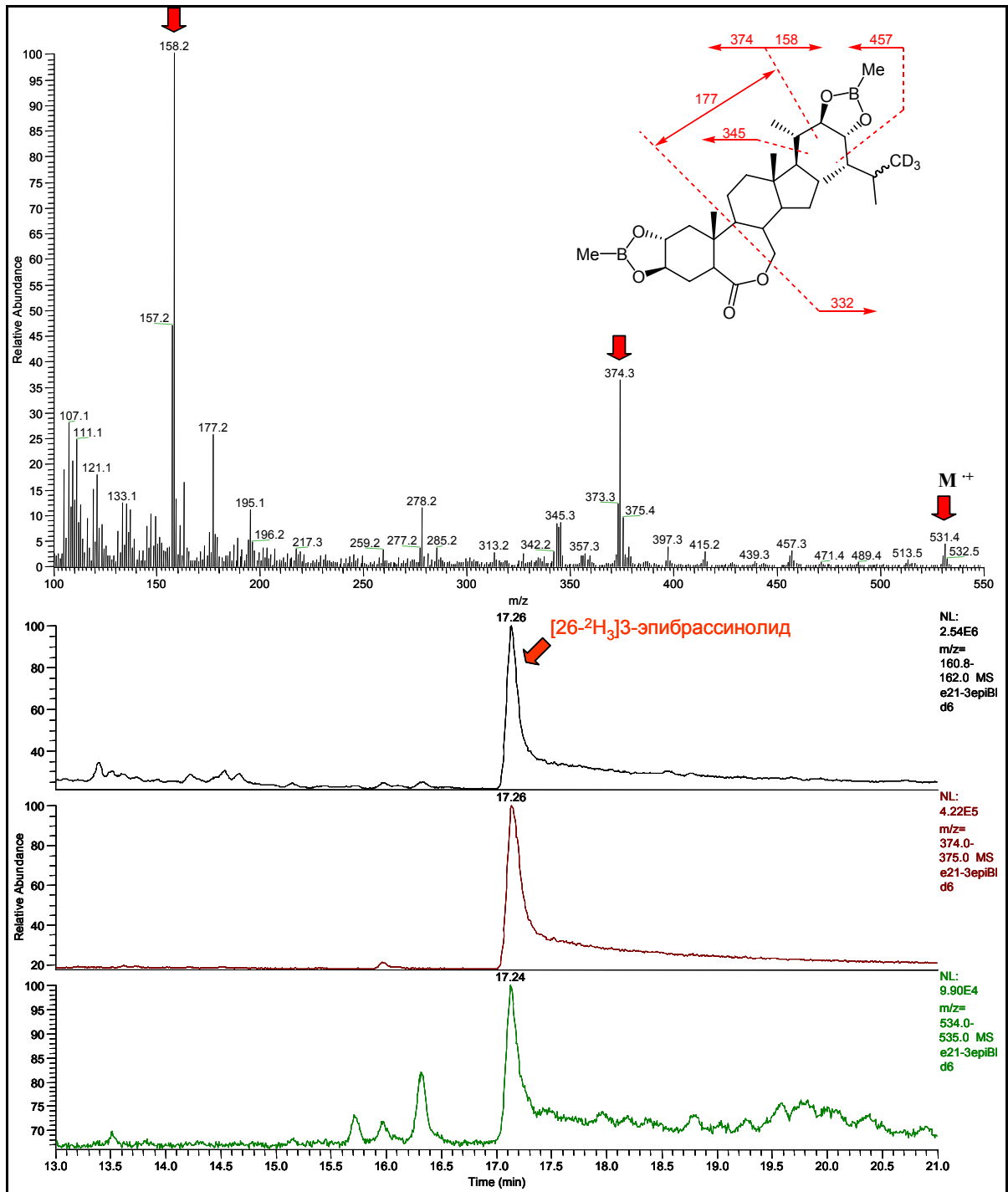


Рисунок 2.11 Идентификация [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]3-эпибрассинолида.



В результате проведенных исследований в качестве модифицирующего агента для анализа brassinosteroidсодержащих фракций растительного материала был выбран бороксин вместо обычно используемой МВА. В комбинации с периодической регенерацией оборудования смесью метанол – этиленгликоль – триэтиламин, он позволил оптимизировать процесс и существенно улучшить эксплуатационные возможности оборудования.

Качественный анализ основывался на одновременном сканировании трех выбранных характеристичных ионов (SIM, selected ion monitoring) и времени удерживания соединений. Например, для анализа  $[26\text{-}^2\text{H}_3]\text{3-эпибрассинолида}$  были выбраны ионы 158 (боковая цепь,  $\text{C}^{20}\text{-C}^{22}$  разрыв), 374 (циклическая часть,  $\text{C}^{20}\text{-C}^{22}$  разрыв +  $\text{H}^+$ ) и 531 (молекулярный пик) (Рисунок 2.11). Пик со временем удерживания 17.26 мин идентифицирован как  $[26\text{-}^2\text{H}_3]\text{3-эпибрассинолид}$ . Количественный анализ базировался на отношении площадей пиков молекулярных ионов для бората эндогенного к дейтерированному с известной концентрацией (метод внутреннего стандарта). Разработанный метод анализа характеризуется воспроизводимостью 98% и пределом детектирования  $3 \cdot 10^{-11}$  г (сигнал/шум = 3).

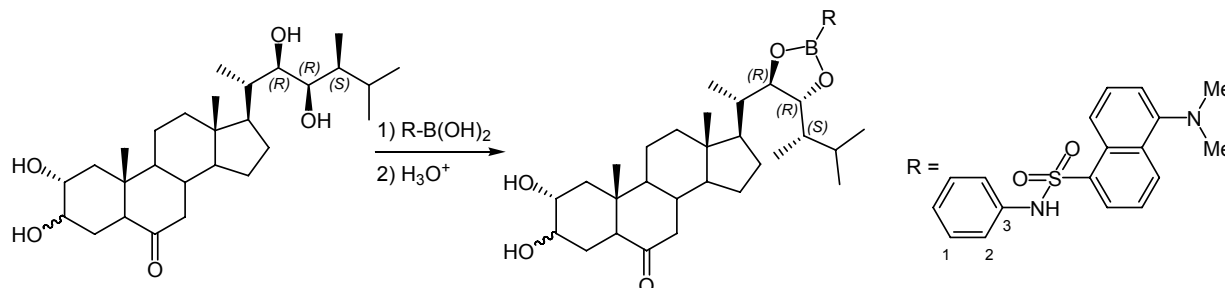
#### **2.4.4. ВЭЖХ-МС анализ brassinosteroidов**

Ввиду низкой летучести brassinosteroidов использование ВЭЖХ может являться альтернативой применению ГХ техники. Несмотря на то, что на заре исследования brassinosteroidов широко использовались методы ВЭЖХ с применением УФ- или флуоресцентного детектирования, позволяющие детектировать до  $2 \cdot 10^{-11}$  г вещества [263, 274-277], ВЭЖХ-МС методы не получили широкого распространения. Основным недостатком ВЭЖХ-МС методов является низкий предел детектирования составляющий  $10^{-9}$  г [278-280]. Поэтому, помимо прочего, наши усилия были направлены на совершенствование ВЭЖХ-МС метода с целью повышения его чувствительности.

Тщательный подбор подвижной фазы, миниатюризация используемого оборудования и применение ионизации методом распыления электронов (ESI, Electrospray Ionization) вместо обычно используемой химической ионизации при атмосферном давлении (APCI, atmospheric pressure chemical ionization) [278-280] впервые позволило нам довести предел обнаружения ВЭЖХ-МС метода до  $10^{-11}$  г brassinosteroidов в смесях стандартов [266]. Однако, проделанные модификации оказались недостаточными для использования данного метода в анализе биологических объектов ввиду сильного влияния сопутствующих соединений, присутствующих в типичных фракциях биоматериала, на степень ионизации, а также присутствия соединений, ионы которых мешают идентификации brassinosteroidов.

Используемые для идентификации brassinosteroidов фракции биологического материала, для которых на последних стадиях выделения

использовались методы ЖХ, содержат большое количество соединений с близкой полярностью. С целью дифференцировать соединения в исследуемой фракции образца, т.е. увеличить селективность и уменьшить эффект сопутствующих соединений, использовались различные алкилборные кислоты, модифицирующие вицинальные диолы. Наилучший результат был получен при использовании коммерчески доступной дансил-3-аминофенилборной кислоты, применяемой для введения люминофорной группы [277, 281]. При использовании данного подхода для brassinosterоидов, содержащих четыре гидроксигруппы (кастастерон, brassинолид и др.), наблюдался частичный гидролиз эфиров борной кислоты (до 5%) с образованием 22,23-производных в условиях обращенно-фазовой хроматографии [276, 279]. В результате детального исследования поведения боратов brassinosterоидов было найдено, что наиболее эффективным является проведение анализа в присутствии слабой кислоты. При этих условиях бис-бораты гидролизуются до моно-22,23-производных (Схема 2.19). В результате удалось полностью избавиться от эффекта сопутствующих соединений, характерного для анализа немодифицированных brassinosterоидов и достичь впечатляющего предела детектирования равного  $5 \cdot 10^{-14}$  г [266]. Т.е. разработанный метод оказался на два порядка чувствительнее использовавшихся ранее методов анализа brassinosterоидов [263, 265, 274, 277, 280-282]!



**Схема 2.19**

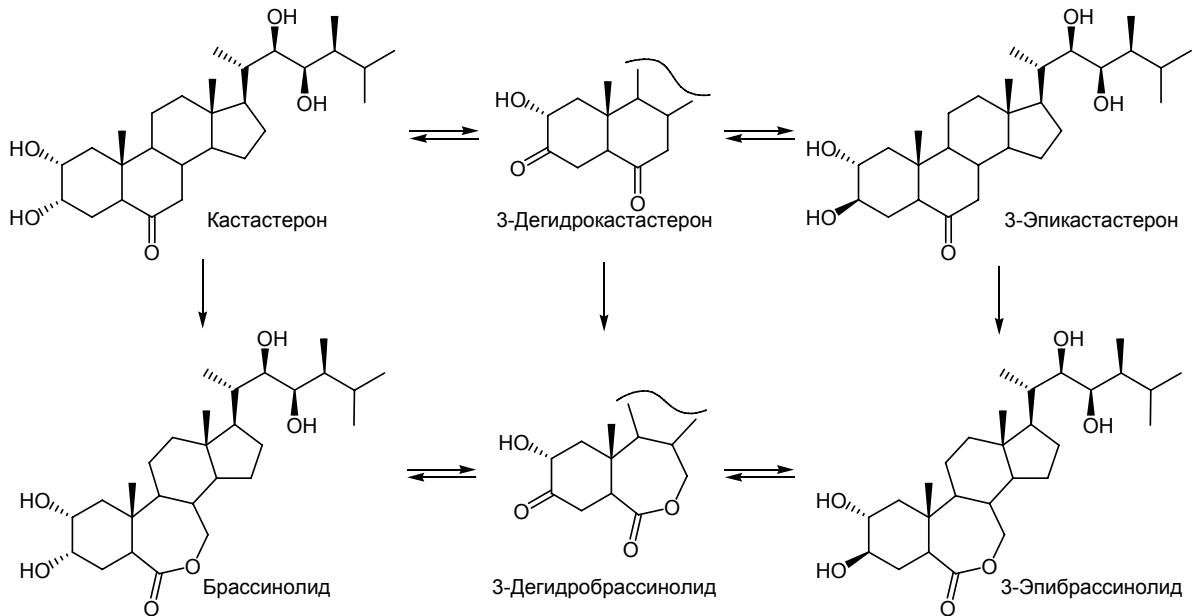
Качественный ВЭЖХ-МС анализ базировался на мониторинге выбранных характеристичных ионов (SIM, selected ion monitoring)  $[M+H]^+$ , кластерных ионов и времени удерживания соединений. Количественный ВЭЖХ-МС анализ базировался на отношении площадей пиков  $[M+H]^+$  ионов 22,23-бората эндогенного стероида к дейтерированному стандарту (метод внутреннего стандарта). Описанный метод анализа характеризуется воспроизводимостью 96% и пределом детектирования  $5 \cdot 10^{-14}$  г (сигнал/шум = 5).

#### **2.4.5. Исследование биосинтеза brassinosterоидов в *Arabidopsis thaliana* и *Lycopersicum esculentum***

В результате исследований биосинтеза brassinosterоидов изучена биотрансформация кампестерина в brassинолид [137, 140-142, 148]. Ключевой стадией биосинтеза brassинолида является окисление кастастерона по Байеру-

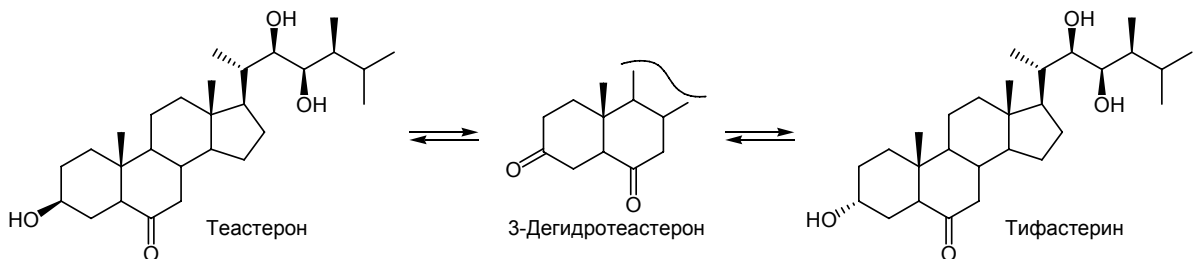
Виллигеру. Однако некоторые из идентифицированных brassinosteroidов остались не включенными в принятую схему биосинтеза: 2-эпикастастерон, 3-эпикастастерон, 2,3-диэпикастастерон и 3-эпибрассинолид [184, 279]. Единственной изученной биотрансформацией является изомеризация катастерона в 3-эпикастастерон в *Nicotiana tabacum* и *Oryza sativa* [283]. Поэтому целью данной части исследования было частичное заполнение пробела и поиска ответов на вопросы:

- Какова роль 3-эпибрассиностероидов в растениях?
- Зависит ли протекание лактонизации в цикле В от заместителей в цикле А?



**Схема 2.20**

Поставленная задача предполагает изучение возможных взаимных биотрансформаций кастастерона, 3-эпикастастерона, брассинолида и 3-эпибрассинолида (Схема 2.20). В число рассматриваемых биосинтетических путей включена обратимая конверсия между  $3\alpha$ - и  $3\beta$ -брасиностероидами, аналогично существующей между теастероном и тифастерином (Схема 2.21) [158] и независящее от заместителей в цикле А окисление по Байеру-Виллигеру производных кастастерона.



**Схема 2.21**

Для исследований использовали пророщенный *Arabidopsis thaliana* возрастом 20 ÷ 30 дней и суспендированный клеточный материал *Lycopersicum esculentum* возрастом 14 дней. При проведении экспериментов с *Arabidopsis thaliana* использовали [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]кастастерон, [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]3-эпикастастерон, [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]брасинолид, [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]3-эпибрасинолид, а для *Lycopersicum esculentum* – [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]кастастерон, [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]брасинолид и [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]3-эпибрасинолид. В результате серии параллельных экспериментов с каждым меченым брасиностероидом были изучены превращения с их участием в *Arabidopsis thaliana* (Таблица 2.1) и *Lycopersicum esculentum* (Таблица 2.2).

Таблица 2.1

**Метаболизм брасиностероидов в *Arabidopsis thaliana***

Брасиностероид	Метаболиты
[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]кастастерон	[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]3-эпикастастерон
	[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]брасинолид
	[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]3-эпибрасинолид
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]3-эпикастастерон	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]кастастерон
	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]брасинолид
[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]брасинолид	[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]3-эпибрасинолид
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]3-эпибрасинолид	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]брасинолид

Таблица 2.2

**Метаболизм брасиностероидов в *Lycopersicum esculentum***

Брасиностероид	Метаболиты
[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]кастастерон	[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]3-эпикастастерон
	[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]брасинолид
[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]брасинолид	[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]3-эпибрасинолид
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]3-эпибрасинолид	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]брасинолид

Полученные результаты биотрансформаций для каждого субстрата обобщены (Схема 2.22 А, *Arabidopsis thaliana*; Схема 2.22 В, *Lycopersicum esculentum*). В результате анализа полученных данных были сделаны заключения о путях биосинтеза брасиностероидов в исследованных растениях. В *Arabidopsis thaliana* (Схема 2.23 А) и *Lycopersicum esculentum* (Схема 2.23 В) кастастерон является биопредшественником 3-эпикастастерона и брасинолида, метаболитом которого является 3-эпибрасинолид. Также, показана обратная конверсия 3-эпибрасинолида в брасинолид. Кроме того, в *Arabidopsis thaliana* показана обратная конверсия 3-эпикастастерона в кастастерон.

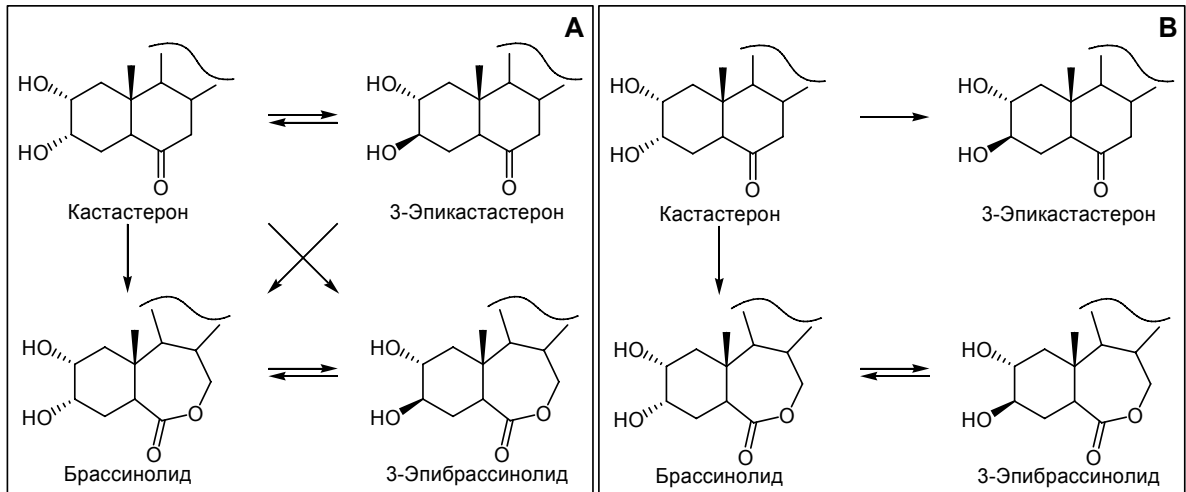


Схема 2.22

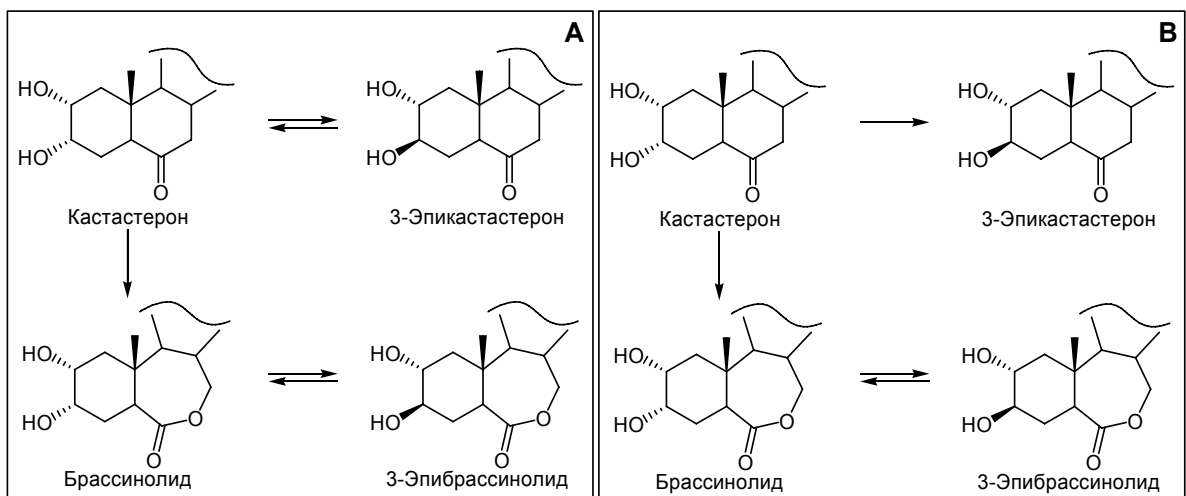


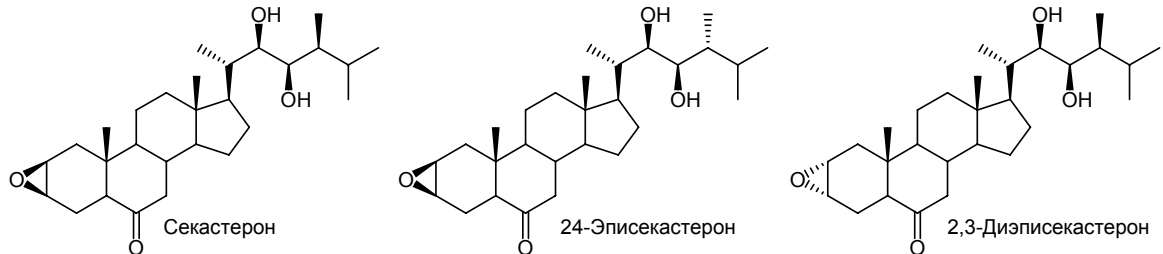
Схема 2.23

В результате проведенных исследований *Arabidopsis thaliana* и *Lycopersicum esculentum* впервые изучен биосинтез 3-эпибрассинолида. Также впервые показана возможность обратимой конверсии между кастастероном и 3-эпикастастероном, брассинолидом и 3-эпибрассинолидом. Исследование продуктов 3-эпимеризации брассиностероидов несомненно может представлять интерес для создания препаратов с пролонгированным действием. А, кроме того, как было показано при исследовании недавно открытой 3-эпимеризации в случае витаминов D, 3-эпи-1 $\alpha$ ,25-дигидроксивитамин D<sub>3</sub> порой является более активным, чем его предшественник – 1 $\alpha$ ,25-дигидроксивитамин D<sub>3</sub> [284].

#### 2.4.6. Исследование биосинтеза брассиностероидов в *Secale cereale*

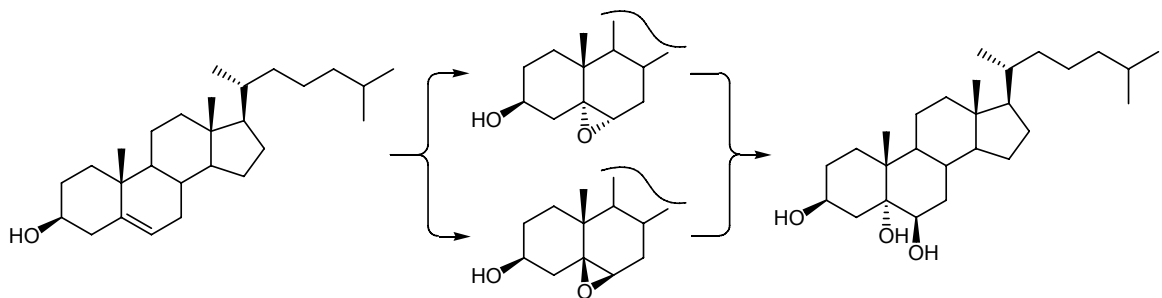
При исследовании брассиностероидного состава *Secale cereale* впервые обнаружен секастерон (Рисунок 2.12) наряду с известными соединениями данного класса – кастастероном, 28-гомокастероном, 6-дезокикастастероном, 28-норкастастероном (брассинон), тифастерином и теастероном [285]. Позже, при

исследовании стероидной композиции семян *Lychnis viscaria*, идентифицирован 24-эписекастерон наряду с 24-эпикастастероном [286]. Секастерон и 24-эписекастерон – представители экзотических природных эпоксибрасиностероидов, их физиологическая роль, пути биосинтеза и метаболизма были неизвестны. Основной целью данной части исследований являлось изучение биосинтеза и метаболизма эпоксибрасиностероидов.



**Рисунок 2.12 Эпоксибрасиностероиды**

Единственным изученным примером биотрансформации эпоксистероидов является исследование 5,6-эпоксихолестанов (Схема 2.24). Следует отметить, что оба эпоксида являются метаболитами холестерина в результате окисления эпоксидазой [287]. При этом  $5\alpha,6\alpha$ - и  $5\beta,6\beta$ -эпоксихолестанол, различающиеся двумя оптическими центрами, являются предшественниками только одного соединения –  $3\beta,5\alpha,6\beta$ -тригидроксихолестана.



**Схема 2.24**

С целью выбора оптимального растительного материала мы использовали *Secale cereale* сортов “Petka” и “Sorom” (для анализа эндогенных брасиностероидов) и дейтерированные секастерон и 2,3-диэписекастерон (в качестве внутреннего стандарта). В результате изучено содержание секастерона в сорте “Sorom”, как в корневой части растения, так и в зеленой части (Таблица 2.3). Кроме того, впервые идентифицирован 2,3-диэписекастерон как природный брасиностероид в обоих сортах *Secale cereale* [245]. С целью получения более полной информации о биотрансформациях эпоксибрасиностероидов, в качестве объекта для дальнейших исследований был выбран сорт “Sorom”, содержащий секастерон и 2,3-диэписекастерон.

Таблица 2.3

Анализ эпоксибрассиностероидов *Secale cereale*

Сорт	Часть растения	Брассиностероид	Содержание, пг/г
Petka	зеленая	2,3-диэписекастерон	120
	корневая	2,3-диэписекастерон	22
Sogom	зеленая	2,3-диэписекастерон	20
		секастерон	52
	корневая	2,3-диэписекастерон	32
		секастерон	107

С целью проверки гипотезы о возможном участии 3-гидроксибрассиностероидов в биосинтезе эпоксипроизводных нами был предпринят анализ теастерона и тифастерина, обнаруженных в *Secale cereale* наряду с секастероном [285], как биосинтетических предшественников. В результате экспериментов было показано превращение обоих предшественников в эпоксибрассиностероиды (Рисунок 2.13).

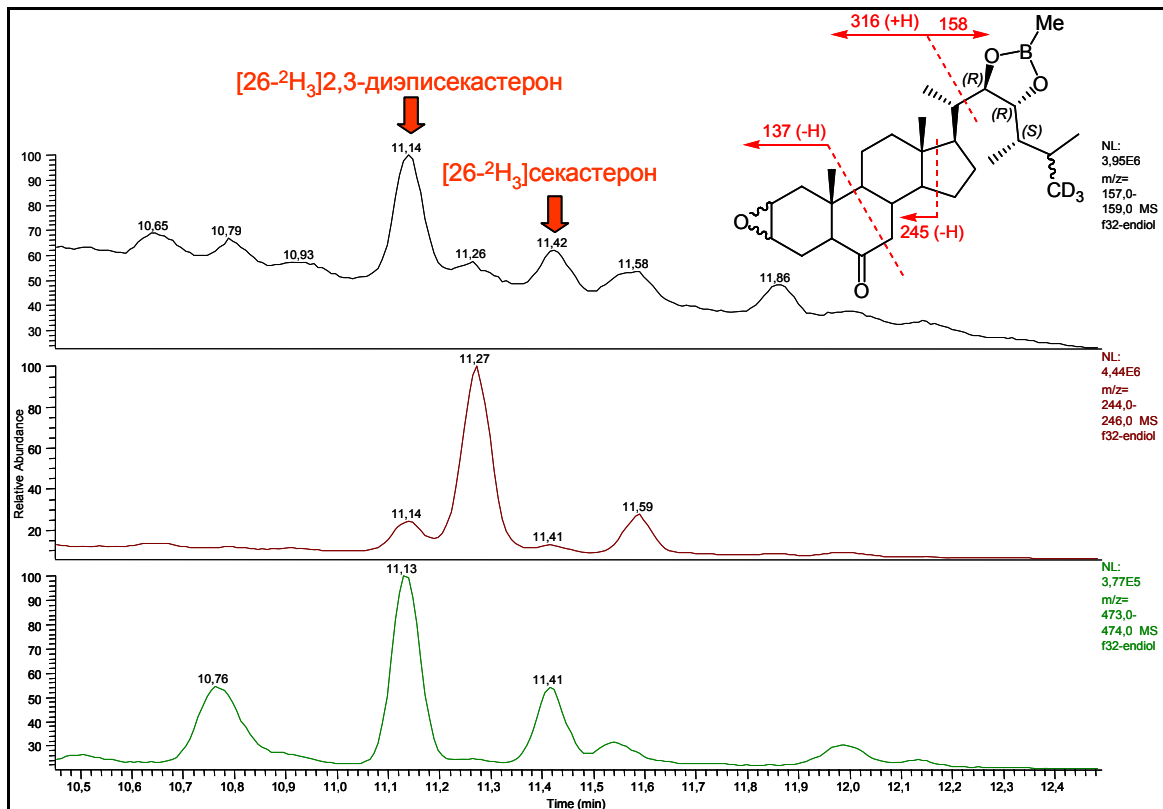


Рисунок 2.13 Идентификация  $[26-^2\text{H}_3]$ 2,3-диэписекастерона и  $[26-^2\text{H}_3]$ секастерона

Определить, какой из брассиностероидов – теастерон или тифастерин – вносит больший вклад в образование эпоксистероидов, не представлялось

возможным даже при совместном использовании обоих соединений (Таблица 2.4) из-за протекания обратимой конверсии между ними (Схема 2.21).

Таблица 2.4

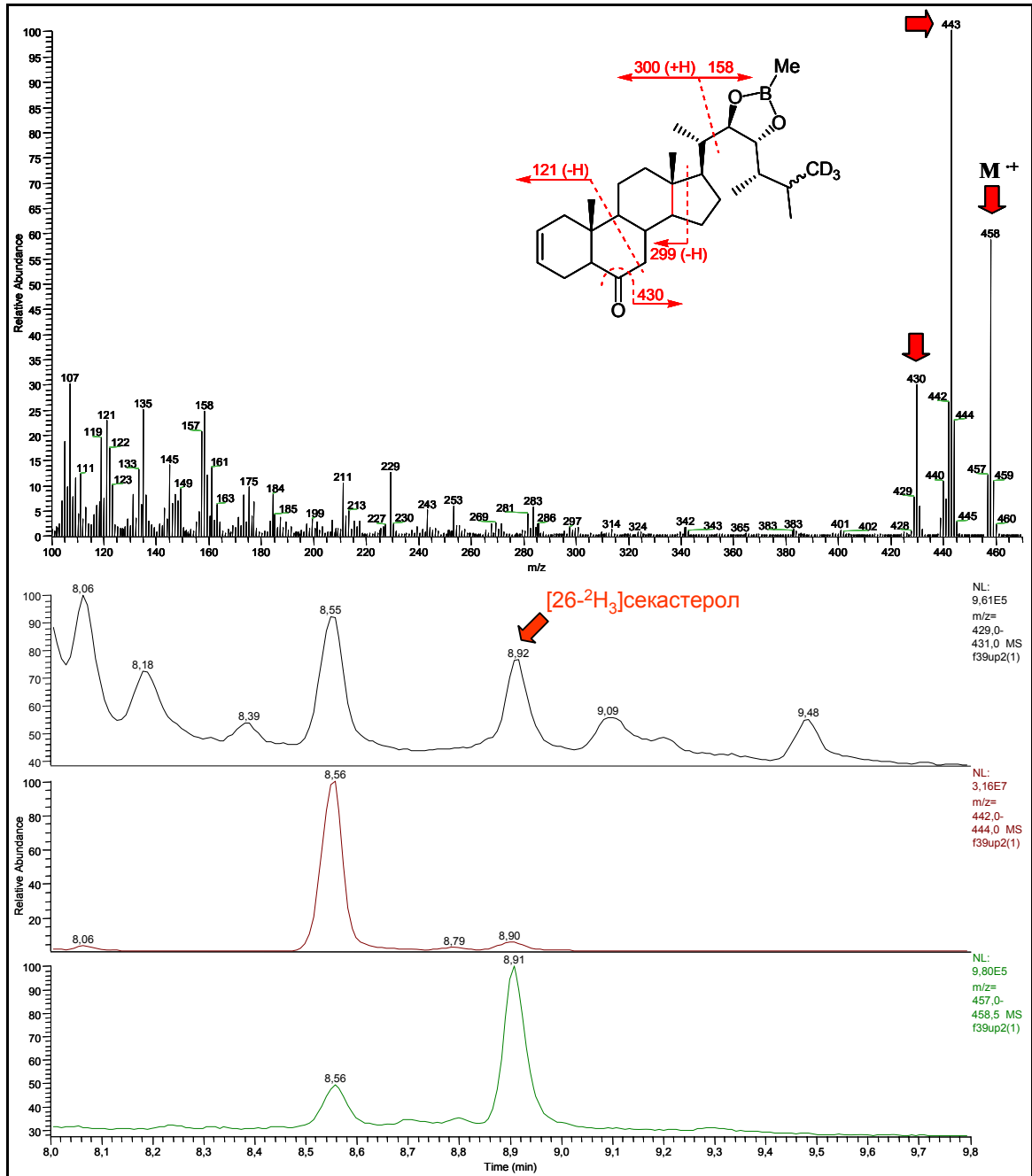
**Метаболизм brassinosterоидов в *Secale cereale***

<b>Брассиностероид</b>	<b>Метаболиты</b>
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]тифастерин	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]секастерон
	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]2,3-диэписекастерон
	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]секастерол
[26,27- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]геастерон	[26,27- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]секастерон
	[26,27- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]2,3-диэписекастерон
	[26,27- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]секастерол
[26,27- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]геастерон + [26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]тифастерин	[26,27- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]секастерол
	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]секастерол
[26,27- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]геастерон + [26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]секастерол	[26,27- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]секастерон
	[26,27- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]2,3-диэписекастерон
	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]секастерон
	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]2,3-диэписекастерон
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]секастерол	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]секастерон
	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]2,3-диэписекастерон
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]2,3-диэписекастерон	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]2-эпикастастерон
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]секастерон	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]кастастерон
	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]2-эпикастастерон
	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]3-эпикастастерон
[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]кастастерон	[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]3-эпикастастерон
	[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]брассинолид
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]2-эпикастастерон	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]кастастерон
	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]брассинолид
	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]3-эпибрассинолид
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]3-эпикастастерон	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]кастастерон
	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]брассинолид
	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]3-эпибрассинолид
[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]брассинолид	[26,28- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]3-эпибрассинолид
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]3-эпибрассинолид	[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]брассинолид

В результате анализа литературных данных о биосинтезе эпоксисоединений мы предложили (22*R*,23*R*,24*S*)-22,23-дигидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холест-2-ен-6-он (секастерол) как возможный метаболит 3-гидроксибрассиностероидов и предшественник секастерона и 2,3-диэписекастерона. Синтезированный его



дейтероаналог (Схема 2.16) был использован в экспериментах. В результате нами впервые был идентифицирован (22*R*,23*R*,24*S*)-22,23-дигидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холест-2-ен-6-он как природный brassinosteroid и назван секастеролом (Рисунок 2.14). Секастерол – первый brassinosteroid, не содержащий гетерофункционализации в цикле А. Также было показано, что секастерол является метаболитом теастерона и тифастерина, окисляемым эпоксидазой в растениях до эпокси-brassinosteroidов (Таблица 2.4).



**Рисунок 2.14** Идентификация  $[26\text{-}^2\text{H}_3]$ секастерола

С использованием меченого секастерона и 2,3-диэписекастерона, был изучен метаболизм эпокси-brassinosteroidов. Показано, что 2,3-диэписекастерон – предшественник 2-эпикастерона, а продуктами биотрансформаций секастерона

оказались кастастерон, 2-эпикастастерон и 3-эпикастастерон (Таблица 2.4). 2-эпикастастерон и 3-эпикастастерон трансформируются в кастастерон в проростках *Secale cereale*. Обнаружены обратимые реакции аналогичные описанным при исследовании *Arabidopsis thaliana* для кастастерона и 3-эпикастастерона, brassinоида и 3-эпибрасиноида (Схема 2.23 А). Также показано, что 2-эпикастастерон и 3-эпикастастерон являются биосинтетическими предшественниками brassinоида и 3-эпибрасиноида, в то время как кастастерон служит биопредшественником brassinоида (Таблица 2.4).

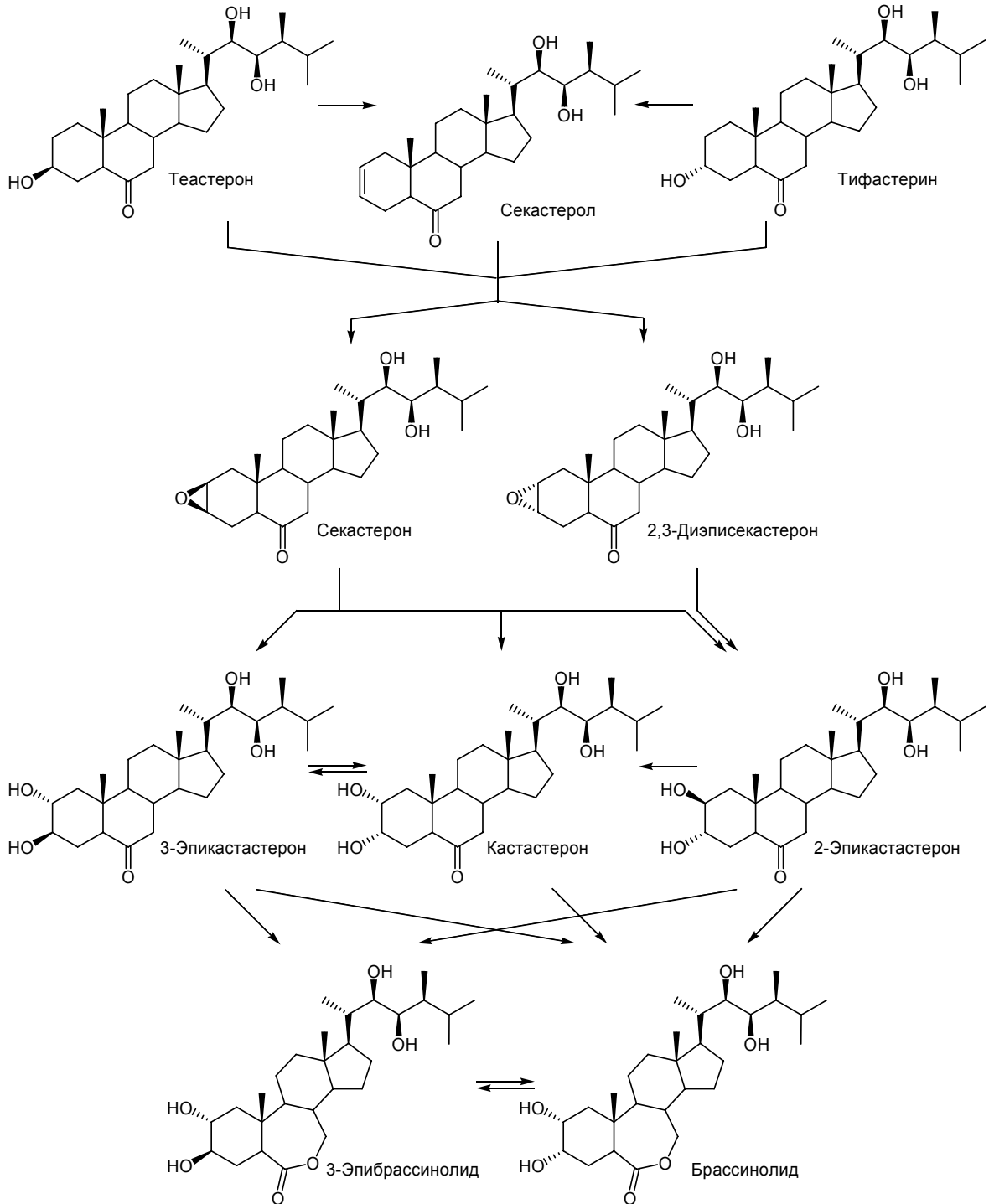


Схема 2.25

Полученные результаты биотрансформаций для каждого субстрата обобщены (Схема 2.25). В результате анализа полученных данных сделаны следующие заключения о путях биосинтеза brassinosterоидов в *Secale cereale* (Схема 2.26):

- Впервые 2,3-диэписекастерон и секастерол идентифицированы как природные соединения.
- Теастерон и тифастерин являются предшественниками секастерола.
- Секастерол нестереоселективно окисляется в смесь секастерона и 2,3-диэписекастерона.
- Раскрытие эпоксидного цикла 2,3-диэписекастерона в *Secale cereale* приводит к образованию 2-эпикастастерона.
- Продуктами трансформации секастерона являются 2-эпикастастерон и 3-эпикастастерон.
- 2-эпикастастерон и 3-эпикастастерон в *Secale cereale* трансформируются в кастастерон.
- Возможны обратимые реакции эпимеризации C<sup>3</sup>-атома углерода для кастастерона и 3-эпикастастерона, brassинолида и 3-эпибрасинолида, аналогичные описанным превращениям (Схема 2.23).
- Кастастерон и 3-эпикастастерон соответственно являются предшественниками brassинолида и 3-эпибрасинолида в *Secale cereale*.
- Обнаружен новый путь трансформации теастерона и тифастерина в кастастерон через эпоксибрасиностероиды, альтернативный трансформациям, наблюдаемым при биосинтезе brassинолида через C-6 “позднее” окисление (Схема 2.27).

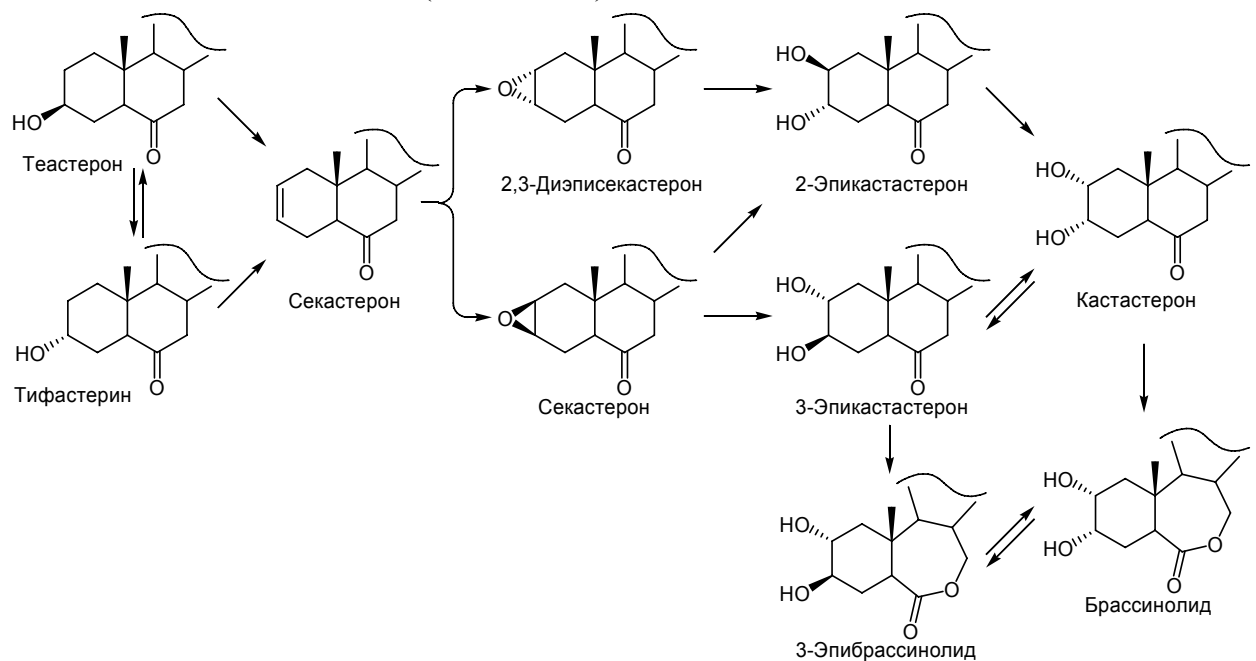


Схема 2.26

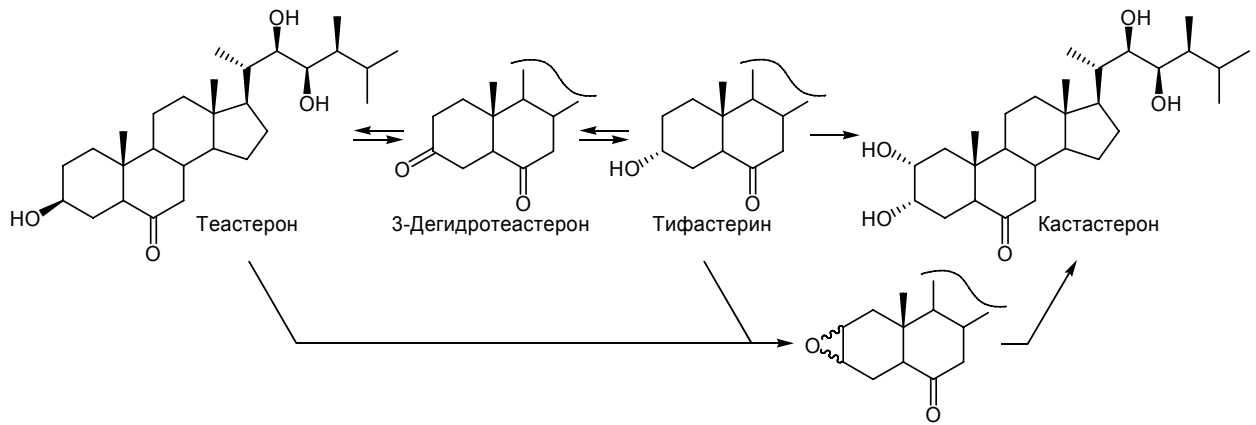


Схема 2.27

### Выводы

В результате проведенных исследований разработан новый эффективный метод выделения brassinостероидсодержащей фракции растительного материала. Разработанные модификации ГХ-МС метода анализа brassinостероидов позволяют более эффективно использовать оборудование и получать надежные результаты. Разработан новый эффективный ВЭЖХ-МС метод анализа brassinостероидсодержащих фракций, который на два порядка чувствительнее известных ранее методов анализа [266]. Изучен биосинтез 3-эпибрасинолида в *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*. Впервые показана возможность обратимой конверсии между  $3\alpha$ - и  $3\beta$ -brassinостероидами в *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*. Открыты два новых brassinостероида 2,3-диэписекастерон и секастерол. Секастерол – первый brassinостероид, не содержащий гетерофункционализацию в цикле А. Исследован биосинтез и метаболизм эпоксибрасиностероидов в *Secale cereale* [245, 288, 289]. Открыт новый альтернативный путь биосинтеза брасинолида в *Secale cereale* через эпоксибрасиностероиды.

### 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### 3.1. Синтез brassinостероидов

Спектры ЯМР записаны в дейтерохлороформе (если не указан иной растворитель) с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта на приборах: Bruker AC-200 (200 МГц для  $^1\text{H}$ , 50 МГц для  $^{13}\text{C}$ ), Bruker AV-400 (400 МГц для  $^1\text{H}$ , 100 МГц для  $^{13}\text{C}$ ) и Bruker DRX-500 (500 МГц для  $^1\text{H}$ , 125 МГц для  $^{13}\text{C}$ ). ИК-спектры сняты на приборе UR-20 в области  $700\text{--}3600\text{ см}^{-1}$  в пленке. Масс-спектры низкого разрешения получены на газовом хроматографе HP5890 (Agilent Technology), оборудованном масс-селективным детектором HP5970 (Agilent Technology), а также на масс-спектрометре Micromass MassSpec методом прямого ввода пробы. Масс-спектры высокого разрешения были получены на масс-спектрометре Micromass MassSpec. Образцы ионизировались методом электронного удара с энергией 70 eV. Температуры плавления измеряли на блоке Кофлера. Очистка и абсолютизация растворителей и реагентов проводились обычными методами, за исключением растворителей для реакций с участием металлорганических реагентов, которые ввиду необходимости глубокой осушки абсолютировались кипячением и перегонкой над натрием или алюмогидридом лития. Протекание реакций контролировалось следующими методами: ТСХ на алюминиевых пластинках с силикагелем Kieselgel 60 F254 (VWR Art. 5715), ГХ на хроматографе HP5890 (Agilent Technology), оборудованном масс-селективным детектором HP5970 (Agilent Technology), и ВЭЖХ с использованием химической станции Agilent 1100 (Agilent Technology) оборудованной диодно-матричным детектором (G1315B) (Agilent Technology). Колоночная хроматография проводилась на силикагеле Kieselgel 60 (VWR, лот № 7734).

**Метилловый эфир 3 $\beta$ -гидрокси-23,24-биснорхол-5-еновой кислоты 2.** К раствору diazometана, приготовленного из 64.5 г N-метил-N-нитрозо-*пара*-толилсульфонамида, присыпали порциями 3 $\beta$ -гидрокси-23,24-биснорхол-5-еновой кислоту **1** (25 г, 72 ммоль). Реакционную смесь выдержали при комнатной температуре в течение 60 минут и отогнали растворитель в вакууме. Выделено 26 г (72 ммоль, 100%) эфира **2**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.70 (с, 3H, 18-Me), 1.05 (с, 3H, 19-Me), 1.20 (д,  $J = 6.7$  Гц, 3H, 21-Me), 3.47-3.61 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H), 3.68 (с, 3H, OMe), 5.31-5.42 (м, 1H, C<sub>6</sub>-H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 12.41, 17.51, 19.78, 21.40, 24.72, 27.54, 32.01, 32.20, 32.28, 36.88, 37.63, 39.93, 42.66, 42.79, 42.86, 50.44, 51.73, 53.25, 56.72, 72.11, 121.92, 141.15, 177.76.

**Метилловый эфир 3 $\beta$ -гидрокси-(4-толуолсульфонат)-23,24-биснорхол-5-еновой кислоты 3.** К раствору эфира **2** (5 г, 13.9 ммоль) в 60 мл пиридина прибавили TsCl (5 г, 26.2 ммоль). Реакционную смесь выдержали в течение 24 часов при комнатной температуре и разбавили водой (400 мл). Образовавшийся

осадок отфильтровали, промыли водой и сушили на воздухе. Выделено 7 г (13.6 ммоль, 98%) тозилата **3**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.68 (с, 3H, 18-Me), 0.97 (с, 3H, 19-Me), 1.18 (д,  $J = 6.8$  Гц, 3H, 21-Me), 2.44 (с, 3H, Me-Ar), 3.63 (с, 3H, OMe), 4.26-4.38 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H), 5.25-5.33 (м, 1H, C<sub>6</sub>-H), 7.32 (д,  $J = 8.1$  Гц, 2H, Ar), 7.79 (д,  $J = 8.3$  Гц, 2H, Ar).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 12.02, 17.13, 19.16, 20.98, 24.32, 27.16, 28.70, 31.81, 31.84, 36.96, 38.93, 39.50, 42.45, 49.96, 51.29, 52.94, 56.31, 82.31, 123.37, 127.68, 129.75, 138.95, 144.37, 177.22.

**(20S)-20-Гидроксиметил-6 $\beta$ -метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -прегнан 4.** Тозилат **3** (7 г, 13.6 ммоль) растворили в смеси метанол – пиридин (105 мл, 20:1) и кипятили в течение 2 часов с обратным холодильником. После охлаждения реакционной смеси до комнатной температуры растворитель отогнали в вакууме. Полученный маслообразный продукт (5.1 г; 6 $\beta$ -метокси/3 $\beta$ -метокси = 10/1 ( $^1\text{H}$  ЯМР)) растворили в диэтиловом эфире (25 мл), прибавили небольшими порциями к перемешиваемой суспензии LiAlH<sub>4</sub> (6.4 г, 168.6 ммоль) в диэтиловом эфире (100 мл). Реакционную смесь выдержали 2 часа при комнатной температуре, затем последовательно прибавили 6.4 мл воды, 6.4 мл раствора NaOH (15%) и 19.2 мл воды. Образовавшуюся суспензию отфильтровали, фильтрат сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и отогнали растворитель в вакууме. К полученному маслообразному продукту (4.15 г) растворенному в THF (20 мл) прибавили BH<sub>3</sub>·THF (10 мл, 1M раствор в THF, 10 ммоль). Реакционную смесь выдержали 14 часов при комнатной температуре, добавили перекись водорода (10 мл, 30% раствор, 79 ммоль) и раствор гидрокарбоната натрия (15 мл, 8.0% раствор) и перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Затем разбавили водой (100 мл) и экстрагировали AcOEt (3 раза по 70 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и отогнали растворитель в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (10:1  $\Rightarrow$  4:1). Выделено 3.62 г (10.4 ммоль, 76%) спирта **4**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 1.03 (с, 3H, 19-Me), 1.05 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-Me), 2.77 (т,  $J = 2.6$  Гц, 1H, C<sub>6</sub>-H), 3.32 (с, 3H, OMe), 3.37 (дд,  $J = 10, 7$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.64 (дд,  $J = 10, 3$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 12.34, 13.09, 16.76, 19.30, 21.52, 22.77, 24.30, 24.98, 27.81, 30.54, 33.38, 35.09, 35.31, 38.78, 40.15, 42.89, 43.41, 48.04, 52.63, 56.27, 56.57, 68.04, 82.41. ВРМС вычислено для C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>: 346.2871. Найдено: 346.2879. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 255 (10), 288 (25), 291 (100), 299 (12) [M-CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 314 (89) [M-CH<sub>3</sub>OH]<sup>+</sup>, 331 (54) [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 346 (49) [M]<sup>+</sup>, 347 (10) [M+H]<sup>+</sup>.

**(20S)-6 $\beta$ -Метокси-20-формил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -прегнан 5.** В двугорлой колбе в атмосфере аргона к раствору оксалилхлорида (9.5 мл, 13.8 г, 108.7 ммоль) в дихлорметане (100 мл) при перемешивании прибавили по каплям DMSO (10.5 мл, 11.6 г, 148.5 ммоль) при -80  $\div$  -72°C. Реакционную смесь выдержали 30 мин, -70  $\Rightarrow$  -65°C, затем реакционную смесь охладили до -75°C и медленно прибавили спирт **4** (3.6 г, 10.38 ммоль) в дихлорметане (30 мл). Затем реакционную смесь выдержали в

течение 60 мин при  $T = -70^{\circ}\text{C}$  и прибавили по каплям триэтиламин (31.0 мл, 22.5 г, 222.6 ммоль),  $T < -65^{\circ}\text{C}$ . После прибавления триэтиламина реакционную смесь выдержали 30 мин,  $T = -65^{\circ}\text{C}$ , и убрали охлаждающую баню. Когда температура реакционной смеси поднялась до  $0^{\circ}\text{C}$ , последовательно при энергичном перемешивании прибавили  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2 г) и 200 мл воды. Затем отделили органическую фазу, а водную экстрагировали  $\text{AcOEt}$  (3 раза по 100 мл). Объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и отогнали растворитель в вакууме. Хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , гексан- $\text{EtOAc}$  (10:1  $\Rightarrow$  4:1). Выделено 3.05 г (8.85 ммоль, 85%) альдегида **5**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.77 (с, 3H, 18-Me), 1.03 (с, 3H, 19-Me), 1.12 (д,  $J = 7$  Гц, 3H, 21-Me), 2.37 (м, 1H,  $\text{C}_{20}\text{-H}$ ), 2.78 (т,  $J = 2.9$  Гц, 1H,  $\text{C}_6\text{-H}$ ), 3.33 (с, 3H, OMe), 9.58 (д,  $J = 3.3$  Гц, 1H, CHO).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 12.63, 13.11, 13.43, 19.29, 21.48, 22.72, 24.56, 24.96, 27.15, 30.54, 33.39, 35.11, 35.26, 39.98, 43.42, 43.44, 48.07, 49.53, 51.24, 55.78, 56.59, 82.30, 205.18. ВРМС вычислено для  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_2$ : 344.2715. Найдено: 344.2719. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 286 (24), 289 (100), 312 (66)  $[\text{M}-\text{CH}_3\text{OH}]^{\bullet+}$ , 313 (18), 329 (61)  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ , 330 (15), 344 (52)  $[\text{M}]^{\bullet+}$ , 345 (12)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**Метилловый эфир 6-кето-3 $\alpha$ ,5-цикло-23,24-биснор-5 $\alpha$ -хололевой кислоты 6.**

К раствору тозилата **3** (7 г, 13.6 ммоль) в ацетоне (150 мл) прибавили  $\text{NaOAc}$  (33 мл 18% раствора) и кипятили в течение 6 часов с обратным холодильником. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры и прибавили 12.5 мл реактива Джонса. Выдержали 20 мин и прибавили 30 мл изопропанола, оставили реакционную смесь на 20 мин при комнатной температуре, затем разбавили ее 300 мл воды и экстрагировали  $\text{AcOEt}$  (3 раза по 150 мл). Объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и отогнали растворитель в вакууме. Хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , гексан- $\text{EtOAc}$  (10:1  $\Rightarrow$  2:1). Выделено 4.2 г (11.7 ммоль, 84%) кетоэфира **6**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 1.20 (д, 3H,  $J = 6.9$  Гц, 21-Me), 3.65 (с, 3H, OMe).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 11.64, 12.18, 17.08, 19.61, 22.80, 24.08, 25.87, 27.07, 33.50, 34.79, 35.23, 39.50, 42.33, 42.78, 44.66, 46.11, 46.30, 46.71, 51.27, 52.86, 56.58, 177.07, 209.09.

**Метилловый эфир 6-(1,3-диоксолан-2-ил)-3 $\alpha$ ,5-цикло-23,24-биснор-5 $\alpha$ -хололевой кислоты 7.** К раствору кетоэфира **6** (4 г, 11.2 ммоль) в 150 мл дихлорметана прибавили  $\text{CH}(\text{OEt})_3$  (17 мл, 15.15 г, 102.2 ммоль), этиленгликоль (11.5 мл, 12.8 г, 206.2 ммоль) и  $\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (130 мг, 0.76 ммоль). Реакционную смесь выдержали 12 часов при комнатной температуре, затем прибавили триэтиламин (1 мл), разбавили водой (100 мл) и выдержали 30 мин при комнатной температуре и интенсивном перемешивании. Отделили органическую фазу, а водную экстрагировали  $\text{CHCl}_3$  (3 раза по 50 мл). Объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и отогнали растворитель в вакууме. Хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , гексан- $\text{EtOAc}$  (10:1  $\Rightarrow$  3:1). Выделено 4 г (9.9 ммоль, 88%) эфира **7**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400

МГц)  $\delta$ : 0.73 (с, 3H, 18-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 1.18 (д,  $J = 6.9$  Гц, 3H, 21-Me), 3.64 (с, 3H, OMe), 3.71-4.05 (м, 4H, диоксолан).

**Восстановление эфира 7 DIBAL-H.** В двугорлой колбе в атмосфере аргона к раствору эфира 7 (2.0 г, 4.97 ммоль) в THF (20 мл) при  $-70^\circ\text{C}$  и перемешивании медленно до полного исчезновения эфира 7 (контроль по ТСХ) прибавили DIBAL-H (8.4 мл, 1,2 М раствор в толуоле, 10.08 ммоль). Реакционную смесь выдержали 3 часа при  $-70^\circ\text{C}$ , затем убрали охлаждающую баню. Когда температура реакционной смеси поднялась до  $0^\circ\text{C}$ , прибавили ацетон (5 мл). Реакционную смесь выдержали 30 мин, профильтровали через слой  $\text{SiO}_2$  и отогнали растворитель в вакууме. Полученный маслообразный продукт хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , гексан-EtOAc (10:1  $\Rightarrow$  1:1). Выделено (в порядке элюирования):

**(20S)-20-гидроксиметил-6-(1,3-диоксолан-2-ил)-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -прегнан 8** 0.81 г (2,16 ммоль, 44%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 1.01 (с, 3H, 18-Me), 1.04 (д,  $J = 6.5$  Гц, 3H, 21-Me), 3.35-3.41 (дд,  $J = 10.3, 7.0$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.62 (дд,  $J = 10.7, 3.4$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.80-4.15 (м, 4H, диоксолан).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 7.35, 12.28, 16.77, 18.97, 22.62, 23.11, 24.33, 24.96, 27.75, 33.33, 34.22, 38.79, 40.07, 40.31, 43.00, 45.68, 47.54, 52.71, 56.10, 64.67, 64.91, 68.03, 109.92.

**(20S)-6-(1,3-диоксолан-2-ил)-20-формил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -прегнан 9** 0.85 г (2,28 ммоль, 46%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.77 (с, 3H, 18-Me), 1.02 (с, 3H, 18-Me), 1.12 (д,  $J = 7$  Гц, 3H, 21-Me), 3.71-4.04 (м, 4H, диоксолан), 9.57 (д,  $J = 3.0$  Гц, 1H, CHO).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 7.36, 12.59, 13.47, 18.97, 22.60, 23.04, 24.59, 24.95, 27.09, 33.35, 34.18, 39.89, 40.29, 43.51, 45.68, 47.57, 49.47, 51.29, 55.63, 64.68, 64.93, 109.78, 204.93.

**Восстановление эфира 7 LiAlH<sub>4</sub>.** К суспензии  $\text{LiAlH}_4$  (4.1 г, 108.0 ммоль) в диэтиловом эфире (70 мл) небольшими порциями прибавили раствор эфира 7 (2.0 г, 4,97 ммоль) в диэтиловом эфире (70мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре, затем последовательно прибавили 4.1 мл воды, 4.1 мл раствора NaOH (15%) и 12.3 мл воды. Образовавшуюся суспензию отфильтровали, фильтрат сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и отогнали растворитель в вакууме. Полученный маслообразный продукт хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , гексан-EtOAc (8:1  $\Rightarrow$  1:1). Выделено 1.61 г (4.30 ммоль, 87%) спирта 8.

**(20S)-6-(1,3-Диоксолан-2-ил)-20-формил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -прегнан 9** получен из спирта 8 с выходом 80% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза соединения 5.

**Окислительное гидроборирование метилового эфира 3 $\beta$ -гидрокси-23,24-биснорхол-5-еновой кислоты 2. Вариант 1.** К раствору эфира 2 (1.00 г, 2.77 ммоль) в THF (10 мл) прибавили раствор  $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$  (4 мл, 1М раствор в THF, 4 ммоль). Реакционную смесь выдержали 12 часов при комнатной температуре, добавили перекись водорода (4 мл, 30% раствор, 32.2 ммоль) и раствор



гидрокарбоната натрия (10 мл, 8 % раствор, 9.5 ммоль) и перемешивали 3 часа при комнатной температуре. Затем разбавили водой (300 мл), выпавшие кристаллы отфильтровали и сушили на воздухе. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (10:1 ⇒ 0:1). Выделено в (порядке элюирования):

**(20S)-20-гидроксиметил-3β,6α-дигидрокси-5α-прегнан 10** 50 мг (0.14 ммоль, 5%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 0.70 (с, 3H, 18-Me), 0.90 (с, 3H, 19-Me), 1.30 (д, J = 6.5 Гц, 3H, 21-Me), 3.55-3.63 (м, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.66-3.75 (м, 1H, C<sub>6</sub>-H), 3.88-3.98 (м, 2H, C<sub>3</sub>- и C<sub>22</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 12.38, 13.77, 17.56, 21.54, 24.67, 28.12, 32.39, 33.75, 34.76, 36.56, 38.06, 39.75, 40.16, 42.80, 42.90, 52.76, 53.21, 54.33, 56.38, 67.04, 68.73, 71.05. ВРМС вычислено для C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>: 350.2821. Найдено: 350.2827. ЭУ-МС <sup>m/z</sup> (%): 213 (19), 231 (38), 232 (28), 246 (11), 264 (10), 299 (6), 314 (7) [M-2H<sub>2</sub>O]<sup>•+</sup>, 317 (10) [M-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 332 (100) [M-H<sub>2</sub>O]<sup>•+</sup>, 333 (25), 350 (2) [M]<sup>•+</sup>.

**(20S)-3β,6α-дигидрокси-20-карбоксиметил-5α-прегнан 11** 500 мг (1.32 ммоль, 48%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 0.62 (с, 3 H, 18-Me), 0.89 (с, 3H, 19-Me), 1.23 (д, J = 6.9 Гц, 3H, 21-Me), 3.64-3.78 (м, 4H, C<sub>6</sub>-H и OMe), 3.93 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 12.29, 13.73, 17.32, 21.45, 24.50, 27.50, 32.38, 33.75, 34.68, 36.56, 38.04, 39.91, 42.68, 42.82, 51.23, 52.75, 53.46, 54.25, 56.12, 60.30, 68.64, 71.01, 176.96. ВРМС вычислено для C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>: 378.2770. Найдено: 378.2774. ЭУ-МС <sup>m/z</sup> (%): 161 (12), 213 (21), 231 (22), 246 (13), 264 (12), 301 (8), 327 (5), 342 (7) [M-2H<sub>2</sub>O]<sup>•+</sup>, 345 (12) [M-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 360 (100) [M-H<sub>2</sub>O]<sup>•+</sup>, 361 (26), 378 (3) [M]<sup>•+</sup>.

**Вариант 2.** К раствору эфира **2** (1.05 г, 2.91 ммоль) в THF (20 мл) прибавили раствор BN<sub>3</sub>·THF (15 мл, 1M раствор в THF, 15 ммоль). Реакционную смесь выдержали 14 часов при комнатной температуре, добавили перекись водорода (15 мл, 30% раствор, 120.9 ммоль) и раствор гидрокарбоната натрия (25 мл, 8.0% раствор) и перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Затем разбавили водой (100 мл) и экстрагировали AcOEt (3 раза по 100 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и отогнали растворитель в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (10:1 ⇒ 0:1). Выделено (в порядке элюирования):

триол **10** 640 мг (1.83 ммоль, 63%)

соединение **11** 310 мг (0.82 ммоль, 28%)

**(20S)-3,6-Дикето-20-карбметокси-5α-прегнан 12.** К раствору триола **10** (600 мг, 1.71 ммоль) в ацетоне (50 мл) прибавили реактив Джонса (5 мл), выдержали реакционную смесь в течение 15 мин при комнатной температуре, затем прибавили изопропиловый спирт (10 мл) и выдержали 15 мин. Разбавили водой (150 мл) и экстрагировали AcOEt (3 раза по 75 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и отогнали растворитель в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (10:1 ⇒ 2:1). Выделено 520 мг (1.44 ммоль, 84%) дикетокислоты **12**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.73 (с, 3H, 18-Me), 0.96 (с,

3H, 19-Me), 1.24 (д,  $J = 7.0$  Гц, 21-Me).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 12.26, 12.60, 17.11, 21.68, 24.14, 27.17, 36.97, 37.35, 37.99, 38.15, 39.29, 41.23, 42.45, 43.17, 46.53, 52.56, 53.52, 56.31, 57.55, 208.64, 211.01.

**(20S)-3,6-Ди(1,3-диоксолан-2-ил)-20-карбметокси-5 $\alpha$ -прегнан 13.** К раствору дикетокислоты **12** (520 мг, 1.44 ммоль) в дихлорметане последовательно прибавили этиленгликоль (1.7 мл, 1.89 г, 30.45 ммоль), триэтилортоформиат (2.8 мл, 2.49 г, 16.8 ммоль) и моногидрат пара-толуолсульфокислоты (20 мг, 0.11 ммоль). Реакционную смесь выдержали 12 часов при комнатной температуре, затем прибавили триэтиламин (0.5 мл), разбавили водой (100 мл) и выдержали 30 мин при комнатной температуре и интенсивном перемешивании. Отделили органическую фазу, а водную экстрагировали  $\text{CHCl}_3$  (3 раза по 60 мл). Объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и отогнали растворитель в вакууме. Хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , гексан-EtOAc (10:1  $\Rightarrow$  3:1). Выделено 540 мг (1.20 ммоль, 83%) кислоты **13**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.70 (с, 3H, 18-Me), 0.95 (с, 3H, 19-Me), 1.23 (д,  $J = 6.8$  Гц, 3H, 21-Me), 2.41 (дк,  $J = 6.8, 3.7$  Гц,  $\text{C}_{20}\text{-H}$ ), 3.70-3.78 и 3.84-3.98 (м, 8H, диоксолан).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 12.26, 13.54, 17.05, 21.07, 24.33, 27.30, 29.29, 31.10, 33.50, 36.93, 37.30, 39.72, 41.22, 42.47, 42.85, 49.62, 52.65, 53.40, 55.72, 64.14, 64.20, 64.30, 65.46, 109.72, 109.77, 181.82. ВРМС вычислено для  $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_6$ : 448.2719. Найдено: 448.2709.

**(20S)-3,6-Ди(1,3-диоксолан-2-ил)-20-гидроксиметил-5 $\alpha$ -прегнан 14.** К суспензии  $\text{LiAlH}_4$  (700 мг, 18.5 ммоль) в диэтиловом эфире (70 мл) небольшими порциями прибавили раствор кислоты **13** (500 мг, 1.11 ммоль) в тетрагидрофуране (20 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре, затем последовательно прибавили 0.7 мл воды, 0.7 мл раствора  $\text{NaOH}$  (15%) и 2.1 мл воды. Образовавшуюся суспензию отфильтровали, фильтрат сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и отогнали растворитель в вакууме. Полученный продукт хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , гексан-EtOAc (10:1  $\Rightarrow$  2:1). Выделено 430 мг (0.99 ммоль, 89%) спирта **14**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.70 (с, 3H, 18-Me), 0.95 (с, 3H, 19-Me), 1.04 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-Me), 3.35 (дд,  $J = 10.5, 6.8$  Гц, 1H,  $\text{C}_{22}\text{-H}$ ), 3.62 (дд,  $J = 10.5, 3.2$  Гц, 1H,  $\text{C}_{22}\text{-H}$ ), 3.70-3.78 и 3.85-3.97 (м, 8H, диоксолан).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 12.18, 13.55, 16.75, 21.11, 24.35, 27.69, 29.32, 31.11, 33.52, 36.92, 37.33, 38.79, 39.77, 41.28, 42.80, 49.66, 52.64, 53.45, 55.85, 64.15, 64.20, 64.30, 65.45, 68.03, 109.77, 109.79.

**(20S)-3,6-Ди(1,3-диоксолан-2-ил)-20-формил-5 $\alpha$ -прегнан 15** получен из спирта **14** с выходом 90% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза соединения **5**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.73 (с, 3H, 18-Me), 0.96 (с, 3H, 19-Me), 1.12 (д,  $J = 7.0$  Гц, 21-Me), 2.35 (м, 1H,  $\text{C}_{20}\text{-H}$ ), 3.71-3.79 и 3.85-3.98 (м, 8H, диоксолан) 9.56 (д,  $J = 3.2$  Гц, 1H, CHO).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 12.49, 13.46, 13.54, 21.05, 24.60, 27.00, 29.30, 31.10, 33.48, 37.33, 39.58, 41.26, 43.30, 49.44, 49.64, 51.19, 53.45, 55.37,

64.14, 64.21, 64.31, 65.46, 109.64, 109.69, 204.87. ВРМС вычислено для  $C_{26}H_{40}O_5$ : 432.2876. Найдено: 432.2874. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 167 (16), 178 (10), 221 (70), 225 (12), 303 (8), 317 (10), 319 (9), 346 (100), 375 (12), 418 (55), 432 (2)  $[M]^{*+}$ .

**(20S)-3,6-Дикето-20-карбоксиметил-5 $\alpha$ -прегнан 16** получен из дигидроксиэфира **11** с выходом 91% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза соединения **12**.  $^1H$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.71 (с, 3H, 18-Me), 0.96 (с, 3H, 19-Me), 1.20 (д,  $J = 6.8$  Гц, 21-Me), 3.65 (с, 3H, OMe).  $^{13}C$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 12.20, 12.57, 17.09, 21.61, 24.04, 26.98, 36.96, 37.34, 37.94, 38.04, 39.13, 41.21, 42.33, 43.04, 46.49, 51.44, 52.78, 53.37, 56.17, 57.46, 177.10, 208.86, 211.20.

**(20S)-3,6-Ди(1,3-диоксолан-2-ил)-20-карбоксиметил-5 $\alpha$ -прегнан 17** получен из дикетозэфира **16** с выходом 73% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза соединения **13**.  $^1H$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.69 (с, 3H, 18-Me), 0.95 (с, 3H, 19-Me), 1.18 (д,  $J = 6.8$  Гц, 21-Me), 3.63 (с, 3H, OMe), 3.70-3.97 (м, 8H, диоксолан).  $^{13}C$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 12.24, 13.54, 17.08, 21.00, 24.24, 27.11, 29.26, 31.05, 33.42, 36.86, 37.25, 39.59, 41.18, 42.49, 42.71, 49.57, 51.33, 52.91, 53.30, 55.61, 64.13, 64.20, 64.30, 65.43, 109.64, 109.68, 177.29. ВРМС вычислено для  $C_{27}H_{42}O_6$ : 462.2981. Найдено: 462.2982. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 167 (8), 225 (13), 265 (100), 266 (21), 363 (13), 390 (74), 403 (8)  $[M-CO_2CH_3]^+$ , 462 (43)  $[M]^{*+}$ , 463 (14)  $[M+H]^+$ .

**Восстановление эфира 17** провели по методике, аналогичной описанной выше для синтеза соединения **14** из кислоты **13**. При этом целевое соединение **14** получено с выходом 86%.

**Синтез спирта 14** из метилового эфира 3 $\beta$ -гидрокси-23,24-биснорхолоевой кислоты **2** без разделения соединений **11** и **12**, и без хроматографической очистки промежуточных продуктов осуществлен с выходом 64%.

**Присоединение метилацетилена к (20S)-6 $\beta$ -метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-20-формил-5 $\alpha$ -прегнану 5**. К 10 мл метилацетилена в атмосфере аргона при  $-60^\circ C$  прибавили раствор бутиллития (9.4 мл, 1.6M раствор в гексане, 15 ммоль). Реакционную смесь выдержали при данной температуре в течение 10 мин, затем дали ей нагреться до  $-30^\circ C$ , добавили диизопропиламин (1.3 мл, 9.2 ммоль). В течение последующих 15 мин температуру поддерживали в интервале  $-30 \div -20^\circ C$ , затем вновь охладили до  $-65^\circ C$  и добавили по каплям раствор (20S)-6 $\beta$ -метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-20-формил-5 $\alpha$ -прегнана **5** (1.5 г, 4.35 ммоль) в 10 мл ТГФ. Реакционную смесь перемешивали при  $-65^\circ C$  в течение 3 ч, затем добавили избыток  $NH_4Cl$ , разбавили водой и экстрагировали хлороформом. Экстракт сушили над сульфатом натрия и упарили. Остаток хроматографировали на  $SiO_2$ , гексан- $EtOAc = 30:1 \Rightarrow 12:1$ . Выделили (в порядке элюирования):

**(22R)-6 $\beta$ -метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-26,27-биснор-5 $\alpha$ -холест-23-ин-22-ол 19** 1.02 г (2.65 ммоль, 62%). Т. пл.  $129-131^\circ C$  (гексан- $EtOAc$ ), лит. [248] Т. пл.  $132-133^\circ C$  (гексан). ИК ( $cm^{-1}$ ): 3440, 2950, 2875, 1470, 1390, 1210, 1105, 1090, 990, 975.  $^1H$  ЯМР

(200 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 1.02 (с, 3H, 19-Me), 1.87 (д, 3H,  $J = 2.5$  Гц, C<sub>25</sub>-H), 2.78 (т, 1H,  $J = 2.5$  Гц, C<sub>6</sub>-H), 3.32 (с, 3H, OMe), 4.44 ш.с. (1H, C<sub>22</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 3.56, 12.2, 13.06, 13.14, 19.3, 21.5, 22.7, 24.2, 24.9, 27.7, 30.5, 33.3, 35.0, 35.3, 40.0, 42.3, 42.7, 43.4, 47.9, 51.9, 56.3, 56.5, 65.6, 80.5, 81.1, 82.4. ВРМС вычислено для C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub>: 384.3028. Найдено: 384.3029. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 69 (42), 81 (38), 105 (39), 159 (27), 283 (100), 315 (21), 329 (73), 352 (55), 369 (41), 384 (71).

**(22S)-6 $\beta$ -метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-26,27-биснор-5 $\alpha$ -холест-23-ин-22-ол 18** 0.48 г (1.48 ммоль, 30%). Т. пл. 136-138°C (гексан-EtOAc), лит. [212] Т. пл. 133-134.5°C (EtOAc). ИК (см<sup>-1</sup>): 3435, 2910, 2880, 1455, 1395, 1380, 1100, 1045, 1025, 1000, 975. <sup>1</sup>H ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 0.75 (с, 3H, 18-Me), 1.02 (с, 3H, 19-Me), 1.86 (д,  $J = 2.5$  Гц, 3H, C<sub>25</sub>-H), 2.77 (т,  $J = 3.2$  Гц, 1H, C<sub>6</sub>-H), 3.32 (с, 3H, OMe), 4.44 (ш.с, 1H, C<sub>22</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 3.64, 12.5, 12.7, 13.1, 19.3, 21.5, 22.8, 24.3, 25.0, 27.5, 30.5, 33.4, 35.1, 35.3, 39.4, 40.2, 42.2, 43.0, 43.4, 48.1, 53.0, 55.5, 56.1, 56.6, 65.8, 77.9, 81.9, 82.4. ВРМС вычислено для C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub>: 384.3028. Найдено: 384.3027. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 81 (38), 105 (38), 159 (28), 283 (100), 315 (21), 329 (79), 344 (11), 352 (54), 369 (40), 384 (67).

**(22R,23E)-6 $\beta$ -Метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-26,27-биснор-5 $\alpha$ -холест-23-ен-22-ол 20.** К раствору лития (220 мг, 31.4 ммоль) в 175 мл жидкого аммиака при -70°C прибавили раствор пропаргилового спирта **18** (1.67 г, 4.3 ммоль) в 100 мл ТГФ и трет-бутиловый спирт (4 мл, 41.8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при -50 ÷ -40°C в течение 6 ч. Затем прибавили избыток NH<sub>4</sub>Cl и реакционную смесь оставили на ночь для испарения аммиака. Остаток разбавили водой, экстрагировали EtOAc. Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упарили. Остаток хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, циклогексан-EtOAc (40:1⇒5:1). Выделено 1.67 г (100%) аллилового спирта **20**. Т. пл. 135-137°C (гексан-EtOAc), лит. [212] Т. пл. 129-130°C (гексан). ИК (см<sup>-1</sup>): 3455, 2950, 2875, 1640, 1480, 1460, 1380, 1095, 1040, 1020, 1000, 980. <sup>1</sup>H ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 0.75 (с, 3H, 18-Me), 1.02 (с, 3H, 19-Me), 1.73 (д,  $J = 5.5$  Гц, 3H, C<sub>25</sub>-H), 2.77 (с, 1H, C<sub>6</sub>-H), 3.38 (с, 3H, OMe), 4.12 (дд, 1H,  $J = 7.5, 3$  Гц, C<sub>22</sub>-H), 5.40-5.80 м (2H, C<sub>23</sub> и C<sub>24</sub>-H). ВРМС вычислено для C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>: 386.3185. Найдено: 386.3186.

**(22S,23Z)-6 $\beta$ -Метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-26,27-биснор-5 $\alpha$ -холест-23-ен-22-ол 21.** К раствору пропаргилового спирта **19** (100 мг, 0.26 ммоль) в 4 мл этанола прибавили 0.025 г 5% палладия на BaSO<sub>4</sub> и хинолин (0.02 мл, 0.24 ммоль). Реакционную смесь гидрировали до прекращения поглощения водорода, отфильтровали от катализатора через слой силикагеля, фильтрат упарили. Остаток хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (40:1⇒10:1). Выделено 75 мг (0.19 ммоль, 75%) аллилового спирта **21**. ИК спектр (см<sup>-1</sup>): 3450, 2945, 2875, 1470, 1390, 1100, 975. <sup>1</sup>H ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 0.75 (с, 3H, 18-Me), 1.02 (с, 3H, 19-Me), 1.66 (д,  $J = 5.5$  Гц, 3H, C<sub>25</sub>-H), 2.77 с (1H, C<sub>6</sub>-H), 3.32 (с, 3H, OMe), 4.57 (д,  $J = 6.5$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-

H), 5.53 м (2H, C<sub>23</sub> и C<sub>24</sub>-H). ВРМС вычислено для C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>: 386.3185. Найдено: 386.3185.

**(22E,24R)-6β-Метокси-3α,5-цикло-24-метил-5α-холест-22-ен-26-овой кислоты этиловый эфир 22.** Смесь аллилового спирта **21** (1.2 г, 3.10 ммоль), триэтилортопропионата (9.7 мл, 49 ммоль) и пропионовой кислоты (0.24 мл, 3.2 ммоль) в бензоле (62 мл) кипятили с обратным холодильником в атмосфере аргона в течение 45 мин. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры, разбавили водой и экстрагировали EtOAc. Органический слой сушили над сульфатом натрия и упарили. Остаток хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, циклогексан-EtOAc (30:1⇒10:1). Выделено 1.4 г (2.97 ммоль, 92%) эфира **22**. ИК спектр (см<sup>-1</sup>): 2950, 2875, 1745, 1465, 1385, 1270, 1190, 1160, 1105, 980. <sup>1</sup>H ЯМР (200 МГц) δ: 0.73 (с, 3H, 18-Me), 1.02 (с, 3H, 19-Me), 2.78 (с, 1H, C<sub>6</sub>-H), 3.33 (с, 3H, OMe), 4.11 (м, 2H, CH<sub>2</sub> в OEt), 5.17 (м, 2H, C<sub>22</sub> и C<sub>23</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (50 МГц) δ: 12.4, 13.0, 13.8, 14.2, 14.2, 15.0, 17.2, 19.25, 19.30, 20.66, 20.76, 21.5, 22.7, 24.12, 24.18, 24.9, 28.59, 28.80, 30.5, 33.3, 35.04, 35.26, 39.38, 39.99, 40.2, 40.3, 42.67, 42.77, 43.4, 45.1, 45.5, 48.0, 55.9, 56.47, 56.51, 56.57, 59.93, 59.96, 82.4, 129.9, 130.4, 136.9, 137.8, 175.8, 176.3.

**Эфир 22** получен также по аналогичной методике из аллилового спирта **20** с выходом 82%.

**(22E,24R)-6β-Метокси-3α,5-цикло-24-метил-5α-холест-22-ен-26-ол 23.** К раствору эфира **22** (153 мг, 0.32 ммоль) в диэтиловом эфире (10 мл) порциями прибавили LiAlH<sub>4</sub> (100 мг, 2.8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин, затем избыток LiAlH<sub>4</sub> разложили последовательным прибавлением воды (0.1 мл), 15%-ного раствора NaOH (0.1 мл) и воды (0.3 мл). Осадок отфильтровали, фильтрат упарили. Остаток хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, циклогексан-EtOAc (15:1⇒5:1). Выделено 128 мг (0.30, ммоль 92%) спирта **23**. ИК спектр (см<sup>-1</sup>): 3390, 2960, 2940, 2875, 1460, 1385, 1105, 1025, 975. <sup>1</sup>H ЯМР (200 МГц) δ: 0.73 (с, 3H, 18-Me), 1.02 (с, 3H, 19-Me), 2.79 (т, J = 2.7 Гц, 1H, C<sub>6</sub>-H), 3.33 (с, 3H, OMe), 3.37-3.68 (м, 2H, C<sub>26</sub>-H), 5.23 и 5.45 (м, 2H, C<sub>22</sub> и C<sub>23</sub>-H). ВРМС вычислено для C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>: 428.3654. Найдено: 428.3645. ЭУ-МС <sup>m/z</sup> (%): 81 (68), 95 (54), 107 (45.5), 123 (70), 159 (36), 227 (27), 255 (65.5), 373 (84), 396 (100), 413 (49), 428 (38).

**(22E,24S)-6β-Метокси-3α,5-цикло-24α-метил-5α-холест-22-ен 24.** К раствору спирта **23** (240 мг, 0.56 ммоль) в пиридине (3 мл) при 20°C прибавили тозилхлорид (0.5 г, 2.62 ммоль). Реакционную смесь выдержали при комнатной температуре в течение 20 часов, затем разбавили насыщенным раствором NaCl и экстрагировали хлороформом. Экстракт сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, упарили. Остаток растворили в 5 мл диэтилового эфира и к полученному раствору при перемешивании порциями прибавили LiAlH<sub>4</sub> (100 мг, 2.8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин, затем добавили 0.1 мл воды, 0.1 мл 15%-ного раствора NaOH и 0.3 мл воды для разложения

избытка  $\text{LiAlH}_4$ . Образовавшийся осадок отфильтровали, фильтрат упарили. Остаток хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , циклогексан-EtOAc (30:1 $\Rightarrow$ 5:1). Выделено 195 мг (0.47 ммоль, 84%) соединения **24**. Т. пл. 73-75 $^\circ\text{C}$  (MeOH-EtOH). ИК ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2955, 2875, 1470, 1390, 1380, 1110, 1025, 980.  $^1\text{H}$  ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 1.02 (с, 3H, 19-Me), 2.77 (с,  $J = 2.5$  Гц, 1H,  $\text{C}_6$ -H), 3.33 (с, 3H, OMe), 5.16 (м, 2H,  $\text{C}_{22}$  и  $\text{C}_{23}$ -H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 11.4, 12.1, 17.0, 18.3, 18.6, 19.1, 20.0, 20.5, 21.8, 23.2, 24.0, 27.9, 29.5, 32.2, 32.4, 34.1, 34.3, 39.2, 39.3, 41.7, 42.1, 42.4, 47.1, 55.1, 55.5, 55.6, 81.4, 130.8, 135.1. ВРМС вычислено для  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ : 412.3705. Найдено: 412.3703.

**(24R)-6 $\beta$ -Метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-24-метил-5 $\alpha$ -холестан 25.** К раствору олефина **24** (100 мг, 0.24 ммоль) в 4 мл этанола прибавили оксид платины (IV) (25 мг). Реакционную смесь гидрировали до прекращения поглощения водорода. Катализатор отфильтровали через слой силикагеля, фильтрат упарили. Остаток хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , гексан-EtOAc (40:1 $\Rightarrow$ 10:1). Выделено 75 мг (0.18 ммоль, 75%) соединения **25**.  $^1\text{H}$  ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 1.02 (с, 3H, 19-Me), 2.77 (с,  $J = 2.5$  Гц, 1H,  $\text{C}_6$ -H), 3.33 (с, 3H, OMe).

**(24R)-3 $\beta$ -Гидрокси-24-метилхолест-5-ен 26, кампестерин.** К раствору стероида **25** (75 мг, 0.18 ммоль) в 3 мл смеси диоксан-вода (3:1) добавили 5 мг TsOH (0.03 ммоль). Реакционную смесь выдержали при 60 $^\circ\text{C}$  в течение 3 часов, затем упарили и разбавили 100 мл воды. Образовавшийся осадок отфильтровали и хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , толуол-EtOAc (30:1 $\Rightarrow$ 5:1) Выделено 72 мг (0.18 ммоль, 98%) соединения **26**. Т. пл. 156-157 $^\circ\text{C}$  (MeOH-EtOAc), лит. [213] Т. пл. 158-159 $^\circ\text{C}$  (MeOH).  $^1\text{H}$  ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 0.76 (с, 3H, 18-Me), 1.04 (с, 3H, 19-Me), 3.55 (м, 1H,  $\text{C}_3$ -H) 5.35 (с, 1H,  $\text{C}_6$ -H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 11.9, 15.4, 18.3, 18.7, 19.4, 20.2, 21.1, 24.3, 28.2, 30.3, 31.7, 31.9, 32.4, 33.7, 35.9, 36.5, 37.3, 38.9, 39.8, 42.3, 50.2, 56.1, 56.8, 71.8, 121.7, 140.8. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 95 (47), 107 (45), 119 (27), 133 (25), 135 (22), 145 (33), 159 (24), 161 (23), 163 (18), 173 (12), 213 (23), 231 (14), 255 (18), 273 (12), 289 (25), 315 (20), 367 (18), 382 (27), 385 (16), 400 (37), 401 (12).

**(22E,24S)-3 $\beta$ -Гидрокси-24-метилхолест-5,22-диен 27, криностерин.** Получен из олефина **24** по методике описанной выше для соединения **26**, с выходом 92%. Т. пл. 154-156 $^\circ\text{C}$  (MeOH-EtOAc), лит. [211] Т. пл. 152-154 $^\circ\text{C}$  (MeOH). ИК ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2940, 2880, 1750, 1650, 1470, 1380, 1060, 970.  $^1\text{H}$  ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 0.70 (с, 3H, 18-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 3.52 (м, 1H,  $\text{C}_3$ -H), 5.06-5.12 (м, 2H,  $\text{C}_{22}$ -H и  $\text{C}_{23}$ -H), 5.16-5.20 (м, 1H,  $\text{C}_6$ -H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 12.06, 18.04, 19.41, 19.64, 20.15, 21.01, 21.09, 24.34, 28.82, 31.68, 31.92, 33.24, 36.53, 37.29, 39.71, 40.26, 42.25, 42.33, 43.07, 50.20, 56.00, 56.90, 71.82, 121.71, 131.85, 136.08, 140.79. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 69 (82), 105 (31), 145 (36), 159 (44), 213 (22), 255 (64), 300 (58), 337 (14), 365 (16), 398 (100).

**(22E,24S)-3 $\alpha$ ,5-Цикло-24-метил-5 $\alpha$ -холест-22-ен-6-он 28.** К раствору диена **27** (10 г, 25.1 ммоль) в пиридине (150 мл) прибавили тозилхлорид (18 г, 94.4 ммоль). Реакционную смесь выдержали при комнатной температуре в течение 14 часов и разбавили водой (500 мл). Выпавший осадок отфильтровали и растворили в ацетоне (1.2 л), прибавили ацетат калия (16 г, 163 ммоль) и воду (16 мл, 0.89 ммоль). Полученный раствор кипятили с обратным холодильником в течение 24 часов, охладили до комнатной температуры и прибавили 15 мл реактива Джонса. Через 15 мин прибавили изопропанол (75 мл) для удаления избытка реактива Джонса, затем реакционную смесь разбавили водой (1000 мл) и экстрагировали хлороформом (3 раза по 500 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом натрия и упарили. Остаток хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, петролейный эфир-EtOAc (30:1 $\Rightarrow$ 10:1). Выделено 6.5 г (16.4 ммоль, 65%) енокетона **28**. ИК (см<sup>-1</sup>): 2970, 2880, 1700, 1470, 1380, 1300, 980. <sup>1</sup>H ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 0.72 (с, 3H, 18-Me), 1.02 (с, 3H, 19-Me), 5.10-5.22 (м, 2H, C<sub>22</sub>-H и C<sub>23</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 11.66, 12.24, 18.07, 19.65, 20.18, 21.00, 22.87, 24.11, 25.91, 28.76, 33.22, 33.49, 34.81, 35.30, 39.65, 40.24, 42.63, 43.10, 44.81, 46.15, 46.33, 46.77, 55.91, 57.13, 132.09, 135.81, 209.68.

**(24S)-24-Метил-5 $\alpha$ -холест-2,22-диен-6-он 29.** К раствору енокетона **28** (4.5 г, 11.3 ммоль) в диметилформаиде (46 мл) добавили пиридиний бромид (6.5 г, 40.6 ммоль). Смесь кипятили с обратным холодильником в течение 2 часов, охладили до комнатной температуры, разбавили водой (100 мл) и экстрагировали хлороформом (3 раза по 50 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом натрия и упарили. Остаток хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, петролейный эфир-этилацетат (30:1 $\Rightarrow$ 5:1). Выделено 4.3 г (10.8 ммоль, 96%) диенона **29**. <sup>1</sup>H ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 0.68 (с, 3H, 18-Me), 0.72 (с, 3H, 19-Me), 1.02 (д,  $J = 7.0$  Гц, 3H, 21-Me), 5.12-5.22 (м, 2H, C<sub>22</sub>-H и C<sub>23</sub>-H), 5.50-5.76 (м, 2H, C<sub>2</sub>-H и C<sub>3</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 12.15, 13.53, 18.08, 19.65, 20.18, 20.98, 21.15, 21.75, 24.01, 28.66, 33.22, 37.74, 39.41, 40.08, 40.23, 42.74, 43.10, 47.04, 53.48, 53.87, 55.93, 56.91, 124.55, 124.99, 132.11, 135.79.

**(22R,23R,24S)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-Тетрагидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холест-6-он 30, кастастерон.** К суспензии диенона **29** (3.2 г, 8.1 ммоль) в смеси трет-бутанол (136 мл) - вода (136 мл) прибавили MeSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (16 г, 168 ммоль), K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (13.4 г, 40.7 ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.8 г, 42.0 ммоль), K<sub>2</sub>OsO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (160 мг, 0.43 ммоль) и (DHQD)<sub>2</sub>AQN (320 мг). Раствор перемешивали в течение 8 суток, затем добавили Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (3.2 г, 25.4 ммоль) и перемешивали в течение часа. После этого реакционную смесь разбавили водой (200 мл) и экстрагировали хлороформом (5 раз по 100 мл). Органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упарили. Остаток хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, хлороформ-метанол (40:1 $\Rightarrow$ 10:1). Выделено 2.1 г (4.5 ммоль, 56%) кастастерона **30**. Т. пл. 249-252°C (MeOH-EtOAc), лит. [290] Т. пл. 259-261°C (MeCN-вода). <sup>1</sup>H ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 0.68 (с, 3H, 18-Me), 0.76 (с, 3H, 19-Me), 2.67 (дд,  $J = 15.6, 3.0$  Гц, 1H, C<sub>5</sub>-H), 3.55 (м, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.72 (д,  $J = 9$  Гц, 1H,

C<sub>23</sub>-H), 3.78 (м, 1H, C<sub>2</sub>-H), 4.05 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (50 МГц, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD = 4:1) δ: 10.32, 11.95, 12.05, 13.64, 20.78, 21.01, 21.43, 24.02, 26.45, 27.69, 30.81, 37.10, 38.08, 39.64, 40.05, 40.45, 42.89, 43.01, 46.87, 51.05, 52.46, 53.87, 56.82, 68.17, 68.36, 73.34, 74.53, 213.95.

**(22*R*,23*R*,24*S*)-2α,3α,22,23-Тетрагидрокси-24-метил-В-гомо-7-окса-5α-холестан-6-он 31, брассинолид.** К охлажденному до 0°C раствору трифторуксусного ангидрида (13.7 мл, 97.0 ммоль) в хлористом метиле (70 мл) при перемешивании добавили перекись водорода (30% раствор, 4 мл, 35 ммоль). Реакционную смесь выдержали при -5°C и интенсивном перемешивании в течение 70 минут, затем охладили до -20°C и прибавили раствор кастастерона **30** (1.9 г, 4.09 ммоль) в хлористом метиле (70 мл). Реакционную смесь выдержали в течение 5 часов при температуре -17 ÷ -25°C, добавили 20 мл насыщенного раствора NaHSO<sub>3</sub> и перемешивали 5 минут. Затем перенесли реакционную смесь в делительную воронку и промыли насыщенным раствором гидрокарбоната натрия до нейтральной реакции. Органический слой отделили и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упарили. Остаток хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, хлороформ-метанол (40:1⇒10:1). К раствору полученного продукта (1.4 г) в хлористом метиле (56 мл) добавили 2,2-диметоксипропан (5.6 мл, 45.5 ммоль) и TsOH (20 мг). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 часов, затем добавили пиридин (2 мл) и упарили. Остаток хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, циклогексан-этилацетат (40:1⇒5:1). Выделенный продукт (1.48 г) растворили в AcOH (22 мл, 0.38 моль), добавили воду (5.5 мл, 0.31 моль) и выдержали при 100°C в течение 4 часов. Затем реакционную смесь упарили и хроматографировали остаток на SiO<sub>2</sub>, хлороформ-метанол (40:1⇒10:1). Выделено 1.12 г (2.33 ммоль, 57%) брассинолида **31**. Т. пл. 268-271°C (MeOH-EtOAc), лит. [291] Т. пл. 274-278°C (MeOH). <sup>1</sup>H ЯМР (200 МГц) δ: 0.72 (с, 3H, C<sub>18</sub>-H), 0.93 (с, 3H, C<sub>19</sub>-H), 3.12 (дд, *J* = 5.0, 12.0 Гц, 1H, C<sub>5</sub>-H), 3.53 (д, 1H, *J* = 9.0 Гц, C<sub>22</sub>-H), 3.70 (дд, *J* = 2.0, 9.0 Гц, 1H, C<sub>23</sub>-H), 3.65-3.76 (м, 1H, C<sub>2</sub>-H), 3.95-4.08 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H), 4.01-4.12 (м, 2H, C<sub>7</sub>-H). <sup>13</sup>C NMR (50 МГц): δ: 9.85, 11.60, 11.67, 15.33, 20.68, 20.95, 22.34, 24.78, 27.59, 30.87, 31.40, 37.11, 38.22, 39.41, 39.75, 40.14, 40.70, 41.48, 42.82, 51.08, 52.45, 58.22, 67.92, 68.08, 70.45, 73.51, 74.56, 176.62.

**2-[(2*R*)-2-Метил-3-(4-метилфенилсульфонил)пропилокси]тетрагидро-2*H*-пиран 34.** К раствору метил (2*R*)-3-гидрокси-2-метилпропионата **33** (20 мл, 21.32 г, 180 ммоль) в DHP (50 мл) прибавили по каплям HCl (37% р-р, 2.5 мл). Реакционную смесь выдержали при комнатной температуре в течение 24 часов, затем добавили пиридин (25 мл). Смесь частично упарили в вакууме, профильтровали через слой SiO<sub>2</sub> и упарили фильтрат. Полученный продукт растворили в Et<sub>2</sub>O (100 мл) и прибавляли к суспензии LiAlH<sub>4</sub> (19.5 г, 0.51 моль) в Et<sub>2</sub>O (200 мл). Реакционную смесь при постоянном перемешивании выдержали 2 ч. Затем добавили 15% раствор NaOH (19.5 мл) и воду (76 мл). Осадок отфильтровали, фильтрат сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упарили. К раствору полученного



продукта в пиридине (140 мл) при охлаждении прибавили тозилхлорид (64.3 г, 0.34 моль). Через 24 часа к реакционной смеси медленно прибавили воду (400 мл) и экстрагировали хлороформом (3 раза по 100 мл). Объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили в вакууме. Остаток хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , петролейный эфир-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  5:1). Выделено 47.0 г (168.9 ммоль, 93%) тозилата **34**. ИК ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2950, 2875, 1610, 1465, 1370, 1195, 1370, 1195, 1185, 1045, 980, 820.  $^1\text{H}$  ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 0.93 (с, 3H, 2-Me), 2.46 (с, 3H, Ph- $\text{CH}_3$ ), 7.36 (д, 2H,  $J = 8$  Гц, Ph), 7.80 (д, 2H,  $J = 8$  Гц, Ph).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 13.58, 13.66, 19.26, 19.40, 19.72, 19.79, 21.60, 25.41, 25.47, 25.70, 30.44, 30.68, 30.94, 33.49, 33.64, 61.92, 62.13, 62.86, 63.33, 67.95, 68.39, 72.21, 94.57, 98.48, 98.87, 99.10, 127.94, 129.80, 133.12, 144.65. ВРМС вычислено для  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{S}$ : 328.1344. Найдено: 328.1246. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 85 (100), 91 (82), 101 (72), 155 (62), 173 (72), 227 (12), 245 (5), 310 (2) [ $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ ] $^{*+}$ , 328 (1) [ $\text{M}$ ] $^{*+}$ .

### 2-[(2*R*)-2-Метил-3-фенилсульфонилпропилокси]тетрагидро-2*H*-пиран **35**.

Тиофенол (51.0 мл, 55 г, 0.5 моль) прибавили к раствору метилата натрия в MeOH, приготовленному из натрия (22.8 г, 0.99 моль) и MeOH (500 мл). Затем при перемешивании прибавили раствор тозилата **34** (47.0 г, 168.9 ммоль) в MeOH (150 мл). Реакционную смесь выдержали в течение 20 часов при комнатной температуре, разбавили водой (400 мл) и экстрагировали гексаном (4 раза по 100 мл). Экстракты объединили, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили в вакууме. Полученный продукт растворили в  $\text{CHCl}_3$  (500 мл) и при охлаждении льдом прибавили mCPBA (70 г, 0.41 моль). Смесь перемешивали в течение 3-х часов при комнатной температуре, прибавили  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25% раствор) до нейтральной среды и воду (400 мл). Отделили органическую фазу, и экстрагировали водную фазу петролейным эфиром (3 раза по 100 мл). Объединенные органические фазы промыли раствором  $\text{NaHCO}_3$ , сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили в вакууме. Остаток хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , петролейный эфир-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  3:1). Выделено 34.5 г (138.9 ммоль, 82%) сульфона **35**. ИК ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2940, 2880, 1600, 1460, 1325, 1155, 980.  $^1\text{H}$  ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 1.12 (дд, 3H,  $J = 8.5$ , 2.5 Гц, 2-Me), 2.24-2.46 (м, 1H,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 2.86-3.16 (м, 2H,  $\text{CH}_2\text{-S}$ ), 3.30-3.84 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 4.42-4.56 (м, 1H, O- $\text{CH-O}$ ), 7.50-7.98 (м, 5H, Ph).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 17.03, 17.25, 19.36, 19.46, 25.35, 29.34, 29.62, 29.65, 30.45, 59.17, 59.47, 62.18, 62.31, 70.43, 71.17, 127.86, 129.25, 133.54, 140.05. ВРМС вычислено для  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{S}$ : 280.1133. Найдено: 280.1132. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 85 (100), 101 (45), 143 (40), 197 (52), 215 (14), 240 (0.5), 280 (0.3) [ $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ ] $^{*+}$ .

### 2-[(2*R*)-2-Метил-3- $^{12}\text{H}_3$ ]метил-3-фенилсульфонил-[4- $^{2}\text{H}_3$ ]бутилокси]

**тетрагидро-2*H*-пиран 36. Вариант 1.** В двугорлой колбе (внутренний термометр, септа) в атмосфере аргона к раствору сульфона **35** (10 г, 34 ммоль) в THF (250 мл) прибавили бутиллитий (40 мл, 2.5 М раствор в гексане, 100 ммоль) при  $-30^\circ\text{C}$ , и через 15 мин прибавили раствор  $\text{CD}_3\text{I}$  (3.4 мл, 7.94 г, 55 ммоль) в THF (10 мл). После этого реакционная смесь нагревалась до  $+10^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Затем

прибавили BuLi (20 мл, 2.5 М раствор в гексане, 50 ммоль) при  $-30^{\circ}\text{C}$ . Выдержали 15 мин, и прибавили раствор  $\text{CD}_3\text{I}$  (3.4 мл, 7.94 г, 55 ммоль) в THF (10 мл). Через 15 мин. охлаждающую баню убрали, и реакционная смесь нагревалась до комнатной температуры, затем последовательно прибавили  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2 г), воду (400 мл) и отделили гексановую фазу. Водную фазу экстрагировали EtOAc (3 раза по 100 мл). Объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель отогнали в вакууме. Полученный продукт очистили хроматографией на  $\text{SiO}_2$  (петролейный эфир-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  3:1)). Выделено 5.5 г (16.5 ммоль, 50%) триметилсульфона **36**. ИК ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2950, 2875, 2245, 1450, 1390, 1360, 1305, 1155, 1085, 1040, 1030, 1010, 980.  $^1\text{H}$  ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 1.12 (дд, 3H,  $J = 7, 5$  Гц, 2-Me), 2.14-2.30 (м, 1H,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 3.14-3.98 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 4.78 (с, 1H, O-CH-O), 7.42-7.86 (м, 5H, Ph).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 13.91, 14.05, 19.40, 25.32, 30.56, 30.59, 36.40, 36.65, 62.12, 62.20, 65.26, 69.62, 69.94, 98.98, 99.07, 128.62, 130.30, 133.36, 136.26. ВРМС вычислено для  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{D}_6\text{O}_3\text{S}$ : 247.1275. Найдено: 247.1275. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 85 (100), 89 (58), 125 (38), 144 (50), 191 (21), 226 (12), 231 (23), 247 (23).

**Вариант 2.** В двугорлой колбе (внутренний термометр, септа) в атмосфере аргона к раствору сульфона **35** (22.2 г, 89.4 ммоль) в THF (210 мл) прибавили бутиллитий (73 мл, 2.7 М раствор в гептане, 197 ммоль) при  $-70 \Rightarrow -45^{\circ}\text{C}$ , и через 5 мин прибавили раствор  $\text{CD}_3\text{I}$  (22.6 г, 156 ммоль) в THF (20 мл) при  $-45 \Rightarrow -30^{\circ}\text{C}$ . Через 5 мин. охлаждающую баню убрали, и реакционная смесь нагревалась до  $-10^{\circ}\text{C}$ , затем последовательно прибавили  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 г), воду (300 мл) и отделили гептановую фазу. Водную фазу экстрагировали EtOAc (3 раза по 100 мл). Объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель отогнали в вакууме. Полученный продукт очистили хроматографией на  $\text{SiO}_2$ , петролейный эфир-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  3:1). Выделено 19.0 г (67.3 ммоль, 75%) триметилсульфона **36**.

**(2R)-2-Метил-3-[ $^2\text{H}_3$ ]метил-3-фенилсульфонил-[4- $^2\text{H}_3$ ]бутанол **37**.** К раствору триметилсульфона **36** (5.5 г, 16.5 ммоль) в MeOH (250 мл) по каплям прибавили HCl (1 мл, 36% раствор). Реакционную смесь выдержали при комнатной температуре в течение 40 мин. добавили пиридин (1 мл) и упарили в вакууме, хроматографировали на  $\text{SiO}_2$  (петролейный эфир-EtOAc (15:1  $\Rightarrow$  1:1)). Выделено 4.1 г (16.5 ммоль, 100%) спирта **37**. ИК ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2990, 2900, 2250, 1590, 1450, 1290, 1150, 1090, 1055, 1025.  $^1\text{H}$  ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 1.16 (д, 3H,  $J = 7$  Гц, 2-Me), 2.12-2.28 (м, 1H,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 2.66 (с, 1H, OH), 3.71 (дд, 1H,  $J = 12, 6$  Гц,  $\text{C}_1\text{-H}$ ), 3.98 (дд, 1H,  $J = 12, 4$  Гц,  $\text{C}_1\text{-H}$ ), 7.52-7.94 (м, 5H, Ph).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 13.60, 39.50, 64.63, 65.44, 128.83, 130.43, 133.66, 136.17. ВРМС вычислено для  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{D}_6\text{O}_3\text{S}$ : 248.1353. Найдено: 248.1351. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 88 (88), 107 (100), 143 (65), 144 (62), 190 (9), 218 (4), 248 (0.2)  $[\text{M}]^{*+}$ .

**(2R)-2-Метил-3-[ $^2\text{H}_3$ ]метил-3-фенилсульфонил-[4- $^2\text{H}_3$ ]бутил 4-метил-1-бензолсульфонат **38**.** К раствору спирта **37** (4.1 г, 16.5 ммоль) в пиридине (100 мл)

прибавили тозилхлорид (19 г, 0.1 моль) и выдержали 3 часа при комнатной температуре. Разбавили водой и экстрагировали хлороформом (3 раза по 75 мл). Объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель отогнали в вакууме, остаток хроматографировали на  $\text{SiO}_2$  (петролейный эфир-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  5:1)). Выделено 6.1 г (15.2 ммоль, 92%) тозилата **38**. ИК ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2990, 2250, 1610, 1455, 1370, 1300, 1195, 1185, 1155, 1105, 970.  $^1\text{H}$  ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 1.12 (д, 3H,  $J = 7$  Гц, 2-Me), 2.26-2.46 (м, 1H,  $\text{C}_2$ -H), 2.46 (с, 3H, OTs- $\text{CH}_3$ ), 4.08 (дд, 1H,  $J = 10$ , 7.5 Гц,  $\text{C}_1$ -H), 4.54 (дд, 1H,  $J = 10$ , 3.5 Гц,  $\text{C}_1$ -H), 7.32-7.88 (м, 9H, Ph и OTs).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 13.12, 21.54, 36.47, 64.43, 65.20, 72.16, 127.60, 129.80, 129.84, 130.22, 132.59, 133.74, 135.45, 144.88. ВРМС вычислено для  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{D}_6\text{O}_3\text{S}$ : 261.1432. Найдено: 261.1431. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 89 (100), 125 (9), 144 (9), 155 (36), 174 (6), 247 (6)  $[\text{M-Ts}]^+$ , 261 (13)  $[\text{M-PhSO}_2]^+$ , 402 (0.2)  $[\text{M}]^{*+}$ .

**(2R)-2-Метил-3-[ $^2\text{H}_3$ ]метил-1-фенилсульфанил-3-фенилсульфонил-[4- $^2\text{H}_3$ ]бутан 39. Вариант 1.** Тиофенол (17.5 мл, 18.9 г, 0.17 моль) прибавили к раствору метилата натрия в MeOH, приготовленному из натрия (10 г, 440 ммоль) и MeOH (150 мл). Затем при перемешивании прибавили раствор тозилата **38** (6.1 г, 15.2 ммоль) в MeOH (100 мл). Реакционную смесь выдержали в течение 40 часов при комнатной температуре и разбавили водой (250 мл). Экстрагировали петролейным эфиром (3 раза по 100 мл), экстракты объединили, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и растворитель отогнали в вакууме, хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , (петролейный эфир-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  5:1)). Выделено 0.8 г (2 ммоль, 13 %) тозилата **38** и 3.5 г (10.3 ммоль, 78% с учетом конверсии) сульфонилсульфида **39**. ИК ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2940, 1730, 1590, 1485, 1450, 1385, 1300, 1250, 1150, 1090, 1030.  $^1\text{H}$  ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 1.10 (д, 3H,  $J = 7$  Гц, 2-Me), 2.08-2.26 (м, 1H,  $\text{C}_2$ -H), 2.60 (дд, 1H,  $J = 13$ , 11 Гц,  $\text{C}_1$ -H), 3.90 (дд, 1H,  $J = 13$ , 1.5 Гц,  $\text{C}_1$ -H), 7.14-7.88 (м, 10H, Ph).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 14.88, 37.19, 37.45, 65.86, 126.30, 128.74, 128.90, 130.14, 130.24, 133.51, 136.07. ВРМС вычислено для  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{D}_6\text{O}_2\text{S}_2$ : 340.1438. Найдено: 340.1436. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 77 (9), 89 (16), 123 (100), 180 (5), 199 (17)  $[\text{M-PhSO}_2]^+$ , 340 (21)  $[\text{M}]^{*+}$ .

**Вариант 2.** К раствору тозилата **38** (22.5 г, 55.9 ммоль) в DMF (120 мл) прибавили карбонат калия (11.7 г, 84.7 ммоль) и тиофенол (8.65 мл, 9.3 г, 84.7 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре и разбавили водой (500 мл). Экстрагировали этилацетатом (3 раза по 100 мл), органические фазы объединили, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и растворитель отогнали в вакууме, и хроматографировали на  $\text{SiO}_2$  (гексан-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  5:1)). Выделено 17.0 г (49.9 ммоль, 89%) сульфонилсульфида **39**.

**(2S)-2-Метил-3-[ $^2\text{H}_6$ ]метил-[4- $^2\text{H}_3$ ]бутил фенил сульфид 40.** К раствору сульфонилсульфида **10** (3.3 г, 9.7 ммоль) в MeOH (200 мл) прибавили при интенсивном перемешивании магний (2 г, 82 ммоль) и выдержали в течение 2 часов. Затем отфильтровали магний и прибавили к фильтрату HCl (3N водный раствор) до нейтральной среды и экстрагировали петролейным эфиром (3 раза по

50 мл). Объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель отогнали в вакууме. После хроматографирования на  $\text{SiO}_2$  (петролейный эфир-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  5:1)) выделено 1.7 г (8.5 ммоль, 88%) сульфида **40**. ИК ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2970, 2940, 2885, 2220, 2080, 1600, 1490, 1450, 1390, 1100, 1065, 1030.  $^1\text{H}$  ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 0.96 (д, 3H,  $J = 7$  Гц, 2-Me), 1.52-1.72 (м, 1H,  $\text{C}_2$ -H), 2.72 (дд, 1H,  $J = 12.5, 8.5$  Гц,  $\text{C}_1$ -H), 3.02 (дд, 1H,  $J = 13, 5$  Гц,  $\text{C}_1$ -H), 7.08-7.42 (м, 5H, Ph).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 15.12, 18.99, 30.95, 38.31, 38.88, 40.39, 125.49, 125.67, 128.74, 128.97, 137.52. ВРМС вычислено для  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{D}_6\text{S}$ : 200.1506. Найдено: 200.1499.

**(2S)-2-Метил-3-[ $^2\text{H}_6$ ]метил-[4- $^2\text{H}_3$ ]бутил фенил сульфид 32.** К раствору сульфида **40** (1.7 г, 8.5 ммоль) в хлороформе (100 мл) и при охлаждении льдом прибавили mCPBA (5.8 г, 34 ммоль). Смесь перемешивали в течение 3-х часов при комнатной температуре, прибавили  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25% раствор) до нейтральной среды и  $\text{H}_2\text{O}$  (100 мл). Отделили органическую фазу, и экстрагировали водную фазу петролейным эфиром (3 раза по 40 мл). Объединенные органические фазы промыли раствором  $\text{NaHCO}_3$ , сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили в вакууме. Остаток хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , петролейный эфир-EtOAc (15:1  $\Rightarrow$  3:1). Выделено 1.2 г (5.2 ммоль, 61%) сульфона **32**.  $^1\text{H}$  ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 1.02 (д, 3H,  $J = 7$  Гц, 2-Me), 1.90-2.10 (м, 1H,  $\text{C}_2$ -H), 2.88 (дд, 1H,  $J = 14, 8.5$  Гц,  $\text{C}_1$ -H), 3.10 (дд, 1H,  $J = 14, 3.5$  Гц,  $\text{C}_1$ -H), 7.45-7.96 (м, 5H, Ph).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 15.95, 31.95, 33.72, 60.50, 127.88, 129.27, 133.54, 140.15. ВРМС вычислено для  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{D}_6\text{O}_2\text{S}$ : 232.1404. Найдено: 232.1404. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 77 (67), 90 (100), 125 (13), 143 (97), 156 (7), 184 (5), 232 (3)  $[\text{M}]^{*+}$ .

**(24S)-[26,27- $^2\text{H}_6$ ]22-Гидрокси-6-(1,3-диоксолан-2-ил)-24-метил-23-фенилсульфонил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холестан 41.** В двугорлой колбе (внутренний термометр, септа) в атмосфере аргона к раствору сульфона **32** (1.47 г, 6.3 ммоль) в THF (30 мл) при  $-70^\circ\text{C}$  прибавили по каплям BuLi (5 мл, 2.7 М раствор в гептане, 13.5 ммоль). Реакционную смесь выдержали при  $-70^\circ\text{C}$  в течение 30 мин и прибавили диизопропиламин (5 мл, 3.6 г, 35.7 ммоль). Через 30 мин по каплям прибавили раствор альдегида **9** (1.93 г, 5.2 ммоль) в THF (30 мл) при  $-70^\circ\text{C}$ , реакционную смесь выдержали в течение 1 ч при  $-70^\circ\text{C}$  и убрали охлаждающую баню. После того, как температура достигла  $0^\circ\text{C}$ , прибавили  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2 г) и воду (100 мл). Экстрагировали EtOAc (3 раза по 70 мл), объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упарили в вакууме. Хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , циклогексан-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  3:1). Выделено 0.53 г (2.3 ммоль, 36.5%) сульфона **32** и 2.24 г гидроксисульфона **41** (3.7 ммоль, 92% – в расчете на сульфид **32** с учетом конверсии).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.72 (с, 3H, 18-Me), 0.76 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 24-Me), 1.00 (с, 3H, 19-Me), 1.21 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-Me), 3.72-4.04 (м, 4H, диоксолан), 7.41-7.94 (м, 5H, Ph).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 7.34, 11.39, 12.21, 13.56, 13.58, 18.97, 22.62, 23.11, 24.08, 24.95, 26.97, 27.82, 29.88, 33.32, 34.25, 34.27, 37.66,

39.33, 40.14, 40.24, 41.19, 42.79, 45.65, 47.46, 47.49, 52.14, 56.24, 64.69, 64.92, 71.05, 71.23, 109.89, 127.71, 128.49, 128.94, 129.09, 132.98.

**(24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]6-(1,3-Диоксолан-2-ил)-24-метил-23-фенилсульфонил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холестан-22-он 42.** В двугорлую колбу (внутренний термометр, септа) в атмосфере аргона поместили оксалилхлорид (2 мл, 22.9 ммоль) в метиленхлориде (50 мл) и охладили до -70°C, прибавили по каплям диметилсульфоксид (2.2 мл, 31.0 ммоль). Через 30 мин при -70°C прибавили раствор гидроксисульфона **41** (600 мг, 1.0 ммоль) в метиленхлориде (20 мл) и выдержали 1 ч. Затем прибавили триэтиламин (6.7 мл, 4.9 г, 48.1 ммоль) и убрали охлаждающую баню. После того, как температура достигла 0°C, прибавили воду (100 мл) и перемешивали 10 мин. Отделили органическую фазу, водный слой экстрагировали метиленхлоридом (3 раза по 50 мл), органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упарили в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, циклогексан-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  5:1). Выделено 590 мг (0.98 ммоль, 98%) кетосульфона **42**. ИК (см<sup>-1</sup>): 2950, 2880, 2225, 1720, 1690, 1660, 1455, 1390, 1310, 1150, 1080. <sup>1</sup>H ЯМР (200 МГц)  $\delta$ : 0.72 (с, 3H, 18-Me), 1.00 (с, 3H, 19-Me), 3.52-4.10 (м, 4H, диоксолан), 7.46-7.96 (м, 5H, Ph). <sup>13</sup>C ЯМР (50 МГц)  $\delta$ : 11.41, 11.68, 12.04, 12.19, 13.55, 18.98, 19.68, 22.60, 22.87, 23.06, 23.93, 24.05, 24.91, 25.91, 27.72, 29.82, 33.25, 33.48, 34.21, 34.86, 35.35, 37.62, 39.25, 39.65, 40.17, 41.12, 42.61, 44.70, 45.59, 46.00, 46.33, 46.73, 47.36, 51.86, 56.85, 63.72, 64.66, 64.68, 70.93, 71.06, 109.67, 127.68, 128.09, 128.97, 133.08, 143.90, 209.53. ВРМС вычислено для C<sub>36</sub>H<sub>46</sub>D<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S: 602.3912. Найдено: 602.3910. ЭУ-МС *m/z* (%): 87 (79), 165 (74), 343 (100), 358 (17), 407 (16), 462 (35), 465 (37), 527 (10), 547 (38), 587 (9) [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 602 (54) [M]<sup>+</sup>.

**(24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]6-(1,3-Диоксолан-2-ил)-24-метил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холестан-22-он 43.** Мелко нарезанную алюминиевую фольгу залили 15% раствором гидроксида натрия, выдержали 15 мин, декантировали и промыли алюминий два раза водой, а затем этанолом. Активированный алюминий обработали раствором сулемы (HgCl<sub>2</sub>, 0.5% раствор) два раза по 10 мин. и промыли образовавшуюся амальгаму этанолом. После этого, амальгаму алюминия количественно перенесли в раствор кетосульфона **42** (700 мг, 1.16 ммоль) в этаноле (150 мл). Реакционную смесь выдержали при комнатной температуре в течение 14 часов. Профильтровали реакционную смесь через слой SiO<sub>2</sub>, и упарили в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, петролейный эфир-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  5:1). Выделено 350 мг (0.76 ммоль, 65%) кетона **43**. ИК (см<sup>-1</sup>): 2270, 2265, 2220, 1720, 1470, 1385, 1170, 1110, 1080. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 0.79 (д, *J* = 6.8 Гц, 3H, 21-Me или 24-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 1.08 (д, *J* = 6.8 Гц, 3H, 21-Me или 24-Me), 3.70-4.03 (м, 4H, диоксолан). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 7.36, 12.43, 15.99, 16.34, 18.97, 22.61, 23.08, 24.48, 24.95, 27.71, 33.35, 34.19, 39.35, 40.09, 40.29, 43.03, 45.69, 46.58, 47.56, 49.80, 52.03, 55.75, 64.68, 64.92, 109.86, 214.10.

**Восстановление кетона 43.** К раствору кетона **43** (80 мг, 0.172 ммоль) в диэтиловом эфире (10 мл) при перемешивании прибавили  $\text{LiAlH}_4$  (175 мг, 4.6 ммоль) и выдержали 2 ч. Избыток  $\text{LiAlH}_4$  разложили добавлением воды (0.7 мл) и гидроксида натрия (0.17 мл, 15% раствора). Отфильтровали осадок, фильтрат сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и растворитель отогнали в вакууме. Выделено 78 мг (0.168 ммоль, 97%) смеси спиртов **44** в виде маслообразного продукта. К раствору полученных спиртов **44** (78 мг, 0.168 ммоль) в ацетоне (20 мл) прибавили раствор пиридиний тозилата (50.0 мг, 0.2 ммоль) в воде (5 мл). Реакционную смесь выдержали при комнатной температуре в течение 8 часов, упарили в вакууме и хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , циклогексан-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  6:1). Выделили в порядке элюирования:

**(22R,24R)-[26,27- $^2\text{H}_6$ ]22-гидрокси-24-метил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холестан-6-он 45b** 6.0 мг (0.014 ммоль, 8%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 0.82 (д, 3H,  $J = 6.4$  Гц, 21-Me или 28-Me), 0.93 (д, 3H,  $J = 6.8$  Гц, 28-Me или 21-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 3.71-3.77 (м, 1H,  $\text{C}_{22}$ -H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 11.69, 12.09, 12.31, 14.96, 15.00, 19.68, 22.89, 24.17, 25.91, 26.92, 27.24, 33.47, 34.12, 34.80, 35.39, 39.71, 42.27, 43.02, 44.79, 46.12, 46.33, 46.74, 53.03, 56.57, 70.89, 209.66.

**(22S,24R)-[26,27- $^2\text{H}_6$ ]22-гидрокси-24-метил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холестан-6-он 45a** 48 мг (0.114 ммоль, 66%).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 0.83 (д, 3H,  $J = 6.6$  Гц, 21- или 28-Me), 0.90 (д, 3H,  $J = 6.6$  Гц, 28- или 21-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 3.78 (т,  $J = 6.7$  Гц, 1H,  $\text{C}_{22}$ -H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 11.27, 11.66, 11.99, 15.82, 19.70, 22.89, 24.01, 25.91, 27.77, 31.58, 33.48, 34.86, 35.33, 39.37, 39.73, 42.65, 44.78, 46.06, 46.33, 46.77, 52.48, 56.90, 71.59, 209.67. ВРМС вычислено для  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{D}_6\text{O}_2$ : 420.3874. Найдено: 420.3888. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 121 (32), 136 (41), 161 (29), 229 (12), 285 (27), 300 (100), 329 (9), 402 (8)  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^{*+}$ , 420 (50)  $[\text{M}]^{*+}$ .

**(22S,24R)-[26,27- $^2\text{H}_6$ ]3 $\beta$ -Бром-22-гидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холестан-6-он 46.** К раствору спирта **45a** (47 мг, 0.111 ммоль) в AcOH (1.5 мл) прибавили HBr (0.16 мл, 48% водный раствор) при комнатной температуре. Реакционную смесь выдержали в течение 30 мин, затем прибавили  $\text{H}_2\text{O}$  (15 мл) и экстрагировали хлороформом (3 раза по 15 мл). Объединенные органические фазы промыли раствором  $\text{NaHCO}_3$  и насыщенным раствором NaCl, затем сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Отогнали растворитель в вакууме, и хроматографировали на  $\text{SiO}_2$  (гексан-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  10:1)). Выделено 56 мг (0.111 ммоль, 100%) гидроксибромида **46**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.68 (с, 3H, 18-Me), 0.80 (с, 3H, 19-Me), 0.82 (д, 3H,  $J = 6.5$  Гц, 21- или 28-Me), 0.89 (д, 3H,  $J = 6.6$  Гц, 28- или 21-Me), 3.77 (т,  $J = 6.7$  Гц, 1H,  $\text{C}_{22}$ -H), 3.89-3.99 (м, 1H,  $\text{C}_3$ -H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 11.21, 11.95, 13.10, 15.78, 15.81, 21.33, 23.88, 27.62, 31.56, 32.34, 33.38, 35.25, 37.86, 39.14, 39.29, 39.40, 40.70, 42.89, 46.55, 50.58, 52.47, 53.78, 56.60, 58.95, 71.61, 209.76.

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22-Гидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холест-2-ен-6-он 47.** К раствору гидроксидбромида **46** (56 мг, 0.111 ммоль) в DMF (2 мл) прибавили Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 мг). Реакционную смесь кипятили при 170°C в течение 50 мин. Затем прибавили воду (15 мл) и экстрагировали хлороформом (3 раза по 15 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  12:1). Выделено 44 мг (0.105 ммоль, 94%) енона **47**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.70 (с, 3H, 18-Me), 0.72 (с, 3H, 19-Me), 0.83 (д, 3H,  $J = 6.3$  Гц, 21- или 28-Me), 0.90 (д, 3H,  $J = 6.9$  Гц, 28- или 21-Me), 3.77 (т,  $J = 6.7$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 5.54-5.72 (м, 1H, C<sub>2</sub>-H и C<sub>3</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 11.24, 11.89, 13.52, 15.82, 21.16, 21.73, 23.30, 23.91, 25.20, 27.64, 31.57, 35.27, 37.79, 39.36, 39.52, 40.06, 42.75, 46.99, 52.51, 53.38, 53.84, 56.68, 71.61, 124.52, 124.96, 211.99.

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22-Тригидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холестан-6-он 48, [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]23-дезоксикастастерон.** К раствору енона **47** (42 мг, 0.10 ммоль) в пиридине (2 мл) прибавили раствор OsO<sub>4</sub> (25 мг, 0.10 ммоль) в трет-бутаноле (1 мл). Реакционную смесь выдержали при комнатной температуре в течение 3 часов при интенсивном перемешивании. Затем прибавили раствор NaHSO<sub>3</sub> (2 мл, 40% раствор) и перемешивали при 35°C в течение 30 мин. Экстрагировали этилацетатом (3 раза по 15 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упарили в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (5:1  $\Rightarrow$  0:1). Выделено 35 мг (0.077 ммоль, 77%) 23-дезоксикастастерона **48**. Т. пл. = 243-246 °C (CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.68 (с, 3H, 18-Me), 0.76 (с, 3H, 19-Me), 0.82 (д, 3H,  $J = 6.5$  Гц, 21- или 28-Me), 0.89 (д, 3H,  $J = 6.6$  Гц, 28- или 21-Me), 2.69 (дд, 1H,  $J = 12.4, 2.9$  Гц, C<sub>5</sub>-H), 3.73-3.80 (м, 2H, C<sub>22</sub>- и C<sub>2</sub>-H), 4.05 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 11.23, 11.97, 13.58, 15.82, 21.24, 23.90, 26.33, 27.65, 31.58, 37.76, 39.36, 39.43, 40.23, 42.61, 42.88, 43.46, 46.76, 50.74, 52.47, 53.71, 56.60, 68.32, 68.42, 71.62, 212.15. ВРМС вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>D<sub>6</sub>O<sub>4</sub>: 454.3929. Найдено: 454.3918; вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>D<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: 436.3824. Найдено: 436.3830. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 81 (18), 93 (16), 121 (17), 163 (10), 247 (11), 289 (15), 316 (57), 334 (100), 345 (5), 336 (3) [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 454 (3) [M]<sup>+</sup>.

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22-Тригидрокси-24-метил-В-гомо-7-окси-5 $\alpha$ -холестан-6-он 49, [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]23-дезоксибрассинолид.** При -20°C раствор 23-дегидроксикастастерона **48** (25 мг, 0.055 ммоль) в метиленхлориде (25 мл) прибавили к раствору CF<sub>3</sub>CO<sub>3</sub>H, полученную прибавлением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.2 мл, 30% водный раствор) к раствору (CF<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O (0.5 мл) в метиленхлориде (5 мл) при -20 °C в течении 30 мин. Реакционную смесь медленно нагревали в течение 5 ч -20°  $\Rightarrow$  0°C, затем обработали избытком раствора NaHSO<sub>3</sub> и экстрагировали CHCl<sub>3</sub> (3 раза по 10 мл). Объединенные органические фазы промыли насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub>, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель отогнали в вакууме. Остаток

хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, хлороформ-метанол (20:1 ⇒ 5:1). Выделено 18 мг (0.038 ммоль, 69%) 23-дезоксибрассинолида **49**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.71 (с, 3H, 18-Me), 0.82 (д, 3H, J = 6.3 Гц, 21- или 28-Me), 0.88 (д, 3H, J = 6.6 Гц, 28- или 21-Me), 0.92 (с, 3H, 19-Me), 3.14 (дд, 1H, J = 12.4, 4.7 Гц, C<sub>5</sub>-H), 3.61-3.80 (м, 2H, C<sub>22</sub>- и C<sub>2</sub>-H), 3.99-4.11 (м, 3H, C<sub>3</sub>-H и C<sub>7</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.17, 11.75, 15.49, 15.81, 22.25, 24.79, 27.60, 31.14, 31.56, 35.27, 38.32, 39.21, 39.38, 39.43, 39.46, 39.62, 40.95, 41.49, 42.54, 51.31, 52.43, 58.15, 68.14, 70.51, 71.51, 176.46.

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22-Ацетокси-24-метил-3α,5-цикло-5α-холестан-6-он 50.** К раствору спирта **45a** (140 мг, 0.33 ммоль) в пиридине (1 мл) прибавили Ac<sub>2</sub>O (0.5 мл). Реакционную смесь выдержали в течение 50 часов при комнатной температуре. Прибавили воду (15 мл), выдержали в течение 15 мин и экстрагировали AcOEt (3 раза по 15 мл), объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и отогнали растворитель в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, петролейный эфир-EtOAc (20:1 ⇒ 10:1). Выделено 154 мг (0.33 ммоль, 100%) ацетата **50**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.70 (с, 3H, 18-Me), 0.82 (д, 3H, J = 6.5 Гц, 21- или 28-Me), 0.95 (д, 3H, J = 6.5 Гц, 28- или 21-Me), 0.98 (с, 3H, 19-Me), 2.00 (с, 3H, OAc), 4.96-5.08 (м, 1H, C<sub>22</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.59, 11.83, 12.60, 15.49, 19.64, 21.23, 22.87, 23.99, 25.88, 28.07, 31.64, 33.47, 34.81, 34.99, 35.21, 35.73, 38.20, 39.69, 42.62, 44.69, 46.05, 46.26, 46.71, 52.48, 56.86, 74.84, 170.69, 209.44.

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]3β,22-Диацетокси-24-метил-5α-холестан-6-он 51.** Раствор ацетата **50** (59 мг, 0.127 ммоль) в уксусной кислоте (1.5 мл) содержащей 3N раствор H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.075 мл) выдержали в течение 60 мин. при 115°C. Затем охладили до комнатной температуры, прибавили воду (15 мл) и экстрагировали хлороформом (3 раза по 10 мл). Объединенные органические фазы промыли раствором NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным раствором NaCl, затем сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Отогнали растворитель в вакууме, и хроматографировали на SiO<sub>2</sub> (петролейный эфир-EtOAc (20:1 ⇒ 10:1)). Выделено 45 мг (0.087 ммоль, 68%) диацетата **51**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.70 (с, 3H, 18-Me), 0.78 (с, 3H, 19-Me), 0.84 (д, 3H, J = 6 Гц, 21- или 28-Me), 0.98 (д, 3H, J = 6.5 Гц, 28- или 21-Me), 2.02 (с, 6H, AcO), 4.66 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H), 4.98-5.12 (м, 1H, C<sub>22</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.83, 12.57, 13.04, 15.49, 21.32, 21.47, 23.90, 26.10, 26.83, 27.95, 31.65, 34.98, 35.71, 36.42, 37.93, 38.15, 39.40, 40.91, 42.89, 46.56, 52.50, 53.81, 56.47, 56.53, 72.82, 74.84, 170.62, 170.77, 210.26. ВРМС вычислено для C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>D<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: 462.3980. Найдено: 462.3978. ЭУ-МС <sup>m/z</sup> (%): 95 (43), 103 (38), 107 (26), 121 (23), 149 (15), 177 (11), 229 (11), 271 (14), 300 (47), 330 (100), 357 (72), 402 (15), 447 (10), 462 (78) [M-AcOH]<sup>+</sup>, 522 (1.5) [M]<sup>++</sup>.

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22-Ацетокси-3β-гидрокси-24-метил-5α-холестан-6-он 52.** К раствору гидроксида калия в метаноле (2%, 8 мл) прибавили диацетат **51** (43 мг, 0.082 ммоль), и выдержали реакционную смесь в течение 50 мин при комнатной температуре. Затем прибавили уксусную кислоту до нейтральной среды



и упарили смесь в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, петролейный эфир-EtOAc (10:1 ⇒ 1:1). Выделено 37 мг (0.077 ммоль, 94%) гидроксиацетата **52**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.66 (с, 3H, 18-Me), 0.76 (с, 3H, 19-Me), 0.84 (д, 3H, *J* = 6.5 Гц, 21- или 28-Me), 0.96 (д, 3H, *J* = 6.5 Гц, 28- или 21-Me), 2.04 (с, 3H, AcO), 3.60 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H), 3.92 (с, 1H, -OH), 5.00-5.12 (м, 1H, C<sub>22</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.82, 12.54, 13.13, 15.49, 20.68, 21.30, 21.53, 23.93, 27.97, 29.91, 30.58, 31.65, 34.89, 35.74, 36.68, 37.93, 38.19, 39.46, 40.94, 42.89, 46.62, 52.53, 53.90, 56.62, 56.77, 70.64, 74.92, 170.69, 210.98. ВРМС вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>D<sub>6</sub>O<sub>2</sub>: 420.3874. Найдено: 420.3889. ЭУ-МС *m/z* (%): 95 (53), 247 (12), 261 (16), 288 (100), 315 (80), 330 (7), 360 (5), 405 (10), 420 (68) [M-AcOH]<sup>+</sup>, 462 (4) [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 480 (2) [M]<sup>•+</sup>.

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]3β,22-Дигидрокси-24-метил-5α-холестан-6-он 53, [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]катастерон.** Растворили гидроксиацетат **52** (8 мг, 0.017 ммоль) в растворе гидроксида калия в метаноле (5%, 5 мл), выдержали при 45°C в течение 5 часов. Затем прибавили уксусную кислоту до нейтральной реакции и отогнали растворители в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, петролейный эфир-EtOAc (5:1 ⇒ 1:1). Выделено 6 мг (0.0137 ммоль, 82%) катастерона **53**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.72 (с, 3H, 18-Me), 0.78 (с, 3H, 19-Me), 0.84 (д, 3H, *J* = 6 Гц, 21- или 28-Me), 0.92 (д, 3H, *J* = 6.5 Гц, 28- или 21-Me), 3.62 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H), 3.72-3.86 (м, 1H, C<sub>22</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.28, 12.02, 13.19, 15.91, 21.63, 23.98, 27.70, 29.72, 30.13, 30.81, 31.66, 35.34, 36.79, 38.04, 39.49, 39.64, 40.97, 42.99, 46.73, 52.67, 54.04, 56.78, 56.88, 70.73, 71.76, 210.63. ВРМС вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>D<sub>6</sub>O<sub>2</sub>: 420.3874. Найдено: 420.3868. ЭУ-МС *m/z* (%): 95 (33), 139 (29), 248 (21), 285 (21), 300 (24), 318 (100), 347 (6), 420 (10) [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 438 (3) [M]<sup>•+</sup>.

**(24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22-Гидрокси-24-метил-3,6-ди(1,3-диоксолан-2-ил)-23-фенилсульфонил-5α-холестан 55.** В двугорлой колбе в атмосфере аргона к раствору сульфона **32** (300 мг, 1.29 ммоль) в THF (10 мл) при -78 °C прибавили по каплям BuLi (1 мл, 2.7 М раствор в гептане, 2.7 ммоль) и выдержали реакционную смесь при -70 ⇒ -60°C в течение 30 мин. Затем прибавили 2,2,6,6-тетрамилпиперидин (1 мл, 0.84 г, 5.95 ммоль) и выдержали при -60 ⇒ -50°C в течение 20 мин. Реакционную смесь охладили до -70°C и по каплям прибавили раствор альдегида **15** (540 мг, 1.25 ммоль) в THF (20 мл), выдержали при -70°C в течение 1 часа, и убрали охлаждающую баню. После того, как температура достигла комнатной, прибавили NH<sub>4</sub>Cl (2 г) и 30 мл воды. Экстрагировали EtOAc (3 раза по 30 мл), объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (10:1 ⇒ 1:1). Выделено 715 мг (1.08 ммоль, 83%) гидроксисульфона **55**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.67 (с, 3H, 18-Me), 0.94 (с, 3H, 19-Me), 3.02 (т, *J* = 4.5 Гц), 3.65 (дд, *J* = 9.5, 2 Гц), 3.74-3.80 и 3.86-3.96 (м, 8H, диоксолан), 4.30 (дд, *J* = 9.5, 4.3 Гц), 7.50-7.62 и 7.88-7.92 (м, 5H, Ph). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.68, 12.30, 13.55, 21.13, 24.10,

27.12, 29.24, 29.28, 29.30, 31.12, 31.16, 33.55, 36.89, 36.92, 37.33, 37.71, 38.99, 39.86, 39.98, 41.17, 42.59, 49.61, 52.08, 52.93, 53.35, 53.38, 53.44, 55.63, 56.01, 56.07, 64.12, 64.14, 64.18, 64.30, 64.41, 65.45, 65.47, 65.92, 70.83, 70.96, 71.21, 109.68, 109.71, 109.74, 109.77, 123.73, 127.69, 128.10, 128.50, 128.89, 129.01, 129.07, 129.32, 132.92, 133.23, 133.44, 135.94, 149.87. ВРМС вычислено для  $C_{38}H_{52}D_6O_7S$ : 664.4280. Найдено: 664.4283. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 99 (100), 207 (10), 225 (15), 235 (23), 360 (18), 404 (35), 432 (11), 452 (9), 467 (11), 468 (11), 524 (7), 593 (14), 664 (12)  $[M]^{*+}$ , 665 (15)  $[M+H]^+$ .

**(24S)-[26,27- $^2H_6$ ]24-Метил-3,6-ди(1,3-диоксолан-2-ил)-23-фенилсульфонил-5 $\alpha$ -холест-22-он 56** получен из гидроксисульфона **55** с выходом 89% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза соединения **42**.  $^1H$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.75 (с, 3H, 18-Ме), 0.96 (с, 3H, 19-Ме), 3.74-3.80 и 3.87-3.97 (м, 8H, диоксолан), 4.36 (м, 1H,  $C_{23}$ -H), 7.51-7.85 (м, 5H, Ph).  $^{13}C$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 11.71, 12.27, 13.56, 15.08, 21.14, 24.57, 27.06, 27.55, 29.30, 31.12, 33.48, 36.91, 37.34, 37.99, 39.95, 41.25, 42.81, 49.63, 51.27, 51.31, 52.05, 53.40, 55.53, 64.14, 64.22, 64.32, 65.48, 109.74, 128.79, 129.96, 134.02, 204.86, 204.89. ВРМС вычислено для  $C_{38}H_{50}D_6O_7S$ : 662.4123. Найдено: 662.4139. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 99 (100), 225 (18), 303 (6), 325 (9), 403 (18), 450 (11), 465 (39), 466 (41), 473 (6), 522 (8), 591 (36), 662 (26)  $[M]^{*+}$ , 663 (32)  $[M+H]^+$ .

**(24R)-[26,27- $^2H_6$ ]24-Метил-3,6-ди(1,3-диоксолан-2-ил)-5 $\alpha$ -холест-22-он 57** получен из кетосульфона **56** с выходом 70% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза соединения **43**.  $^1H$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.70 (с, 3H, 18-Ме), 0.95 (с, 3H, 19-Ме), 2.36 (дд,  $J = 17$ , 4 Гц), 2.48 (м, 1H), 3.72-3.78 и 3.86-3.98 (м, 8H, диоксолан).

**(22S,24R)-[26,27- $^2H_6$ ]22-Гидрокси-24-метил-3,6-ди(1,3-диоксолан-2-ил)-5 $\alpha$ -холестан 58**. К суспензии  $LiAlH_4$  (115 мг, 3.03 ммоль) в диэтиловом эфире (10 мл) прибавили раствор кетона **57** (108 мг, 0.207 ммоль) в диэтиловом эфире (10 мл). Суспензию перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре, затем последовательно прибавили воду (0.115 мл), раствор NaOH (15% раствор, 0.115 мл) и воду (0.345 мл). Образовавшуюся суспензию отфильтровали, фильтрат сушили над  $Na_2SO_4$  и отогнали растворитель в вакууме. Полученный продукт хроматографировали на  $SiO_2$ , гексан-EtOAc (10:1  $\Rightarrow$  1:1). Выделено 90 мг (0.172 ммоль, 83%) спирта **58**.  $^1H$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.69 (с, 3H, 18-Ме), 0.83 (д,  $J = 6.2$  Гц, 3H, 21- или 28-Ме), 0.87 (д,  $J = 6.2$  Гц, 3H, 28- или 21-Ме), 3.72-4.98 (м, 9H, диоксолан и  $C_{22}$ -H).  $^{13}C$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 11.19, 11.97, 13.51, 15.74, 15.77, 21.03, 24.09, 27.74, 29.22, 31.00, 31.51, 33.43, 35.20, 36.80, 37.20, 39.26, 39.29, 39.35, 39.79, 41.16, 42.52, 49.52, 52.55, 53.26, 55.91, 64.08, 64.14, 64.25, 65.40, 71.63, 109.69, 109.71. ВРМС вычислено для  $C_{32}H_{48}D_6O_5$ : 524.4348. Найдено: 524.4344. ЭУ-МС  $m/z$

(%): 99 (100), 207 (6), 225 (19), 327 (44), 328 (42), 452 (45), 453 (49), 481 (6), 524 (34)  $[M]^{*+}$ , 525 (36)  $[M+H]^+$ .

**(22*S*,24*R*)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-22-Гидрокси-24-метил-5α-холест-3,6-дион 54.** К раствору спирта **58** (90 мг, 0.172 ммоль) в ацетоне (50 мл) прибавили 0.5 мл соляной кислоты (37% раствор, 6.0 ммоль). Реакционную смесь выдержали в течение 60 мин при 60°C, затем прибавили триэтиламин (1 мл, 7.2 ммоль) и упарили в вакууме. Полученный продукт хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-ЕтОАс (10:1 ⇒ 1:2). Выделено 58 мг (0.133 ммоль, 77%) diketона **54**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.71 (с, 3H, 18-Me), 0.83 (д, *J* = 7.3 Гц, 3 H, 21- или 28-Me), 0.90 (д, *J* = 6.6 Гц, 3H, 28- или 21-Me), 3.77 (дт, *J* = 6.6, 0.7 Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.23, 11.97, 12.57, 15.79, 15.82, 21.69, 23.94, 27.64, 31.56, 35.28, 36.98, 37.37, 38.07, 39.34, 39.38, 39.49, 41.26, 42.92, 46.58, 52.49, 53.40, 56.52, 57.47, 71.56, 209.10, 211.26. ВРМС вычислено для C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>O<sub>3</sub>: 345.2430. Найдено: 345.2430. ЭУ-МС *m/z* (%): 138 (26), 163 (11), 168 (11), 223 (10), 245 (13), 246 (12), 260 (10), 287 (33), 299 (9), 301 (7), 316 (100), 345 (5)  $[M-C_7H_7D_6]^+$ .

**(24*S*)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-22-Гидрокси-24-метил-6β-метокси-23-фенилсульфонил-3α,5-цикло-5α-холестан 59** получен присоединением сульфона **32** к альдегиду **5** с выходом 83% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза соединения **55**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.71 (с, 3H, 18-Me), 1.01 (с, 3H, 18-Me), 3.32 (с, 3H, OMe), 3.66 (м, 1H), 4.29-4.34 (м, 1H), 7.50-7.68 и 7.89-7.94 (м, 5H, Ph). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.38, 12.25, 13.09, 13.53, 13.56, 15.90, 15.95, 19.28, 21.47, 21.54, 22.77, 24.03, 24.95, 27.86, 29.81, 30.60, 31.96, 33.36, 35.05, 35.23, 37.62, 40.20, 41.09, 42.68, 43.36, 47.94, 52.06, 56.39, 56.60, 60.55, 70.94, 71.20, 82.38, 127.66, 127.83, 127.88, 128.93, 129.08, 129.25, 133.00, 133.50.

**(24*S*)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-24-Метил-6β-метокси-23-фенилсульфонил-3α,5-цикло-5α-холест-22-он 60** получен из гидроксисульфона **59** с выходом 87% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза соединения **42**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.98-1.03 (м, 6H, 18- и 19-Me), 3.32 (с, 3H, OMe), 4.35-4.40 (м, 1H, C<sub>23</sub>-H), 7.49-7.95 (м, 5H, Ph). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 12.19, 12.61, 13.15, 15.56, 15.95, 16.00, 19.26, 19.30, 21.52, 21.59, 22.73, 22.86, 24.44, 24.58, 24.98, 25.02, 28.22, 30.57, 32.01, 33.44, 33.71, 33.73, 33.84, 35.13, 40.09, 43.43, 48.05, 48.11, 50.95, 51.14, 55.90, 56.58, 60.67, 82.39, 127.93, 128.79, 128.83, 129.26, 129.61, 129.95, 133.48, 133.75.

**(24*R*)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-24-Метил-6β-метокси-3α,5-цикло-5α-холест-22-он 61** получен из кетосульфона **60** с выходом 68% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза соединения **43**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.74 (с, 3H, 18-Me), 0.80 (д, *J* = 6.6 Гц, 3H, 28-Me), 1.03 (с, 3H, 19-Me), 1.08 (д, *J* = 7 Гц, 3H, 21-Me), 2.23 (дд, *J* = 17, 9.2 Гц, 1H), 2.36 (м, 1H), 2.50 (м, 1H), 2.76 (т, *J* = 2.9 Гц, 1H, C<sub>6</sub>-H), 3.32 (с, 3H, OMe). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 12.50, 13.15, 16.35, 19.29, 21.56, 22.79, 24.49, 25.01, 27.75, 27.80, 30.59, 33.46, 35.18, 35.36, 40.24, 42.97, 43.48, 46.69, 46.72, 48.14, 49.75,

49.79, 52.08, 55.99, 56.59, 82.45, 214.23. ВРМС вычислено для  $C_{29}H_{42}D_6O_2$ : 434.4031. Найдено: 434.4023. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 119 (60), 120 (46), 213 (17), 255 (17), 283 (39), 327 (15), 379 (84), 380 (89), 385 (20), 402 (77)  $[M-CH_3OH]^+$ , 403 (82), 417 (11), 419 (54)  $[M-CH_3]^+$ , 420 (56), 434 (92)  $[M]^+$ , 435 (100)  $[M+H]^+$ .

**Восстановление кетона 61** проводили по методике, аналогичной описанной выше для восстановления кетона **57**. Выделено в порядке элюирования:

**(22R,24R)-[26,27- $^2H_6$ ]22-гидрокси-24-метил-6 $\beta$ -метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холестан 62** с выходом 11%.  $^1H$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 0.82 (д,  $J = 6.8$  Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.92 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 28- или 21-Me), 1.02 (с, 3H, 19-Me), 2.77 (т,  $J = 2.9$  Гц, 1H, C<sub>6</sub>-H), 3.32 (с, 3H, OMe), 3.74 (ддд,  $J = 11, 3, 1.2$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H).  $^{13}C$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 12.28, 13.08, 14.97, 19.29, 21.49, 22.80, 24.29, 24.98, 27.40, 30.53, 33.36, 34.09, 34.12, 35.07, 35.28, 40.28, 42.40, 43.07, 43.39, 48.07, 53.24, 56.11, 56.56, 70.98, 82.38. ВРМС вычислено для  $C_{29}H_{44}D_6O_2$ : 436.4187. Найдено: 434.4194. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 213 (16), 255 (10), 261 (12), 284 (34), 364 (14), 381 (48), 382 (46), 404 (42)  $[M-CH_3OH]^+$ , 405 (39), 419 (12)  $[M+H-H_2O]^+$ , 421 (30)  $[M-CH_3]^+$ , 422 (32), 436 (100)  $[M]^+$ , 437 (52)  $[M+H]^+$ .

**(22R,24R)-[26,27- $^2H_6$ ]22-гидрокси-24-метил-6 $\beta$ -метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холестан 63** с выходом 77%.  $^1H$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 0.83 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.89 (д,  $J = 6.2$  Гц, 3H, 28- или 21-Me), 2.78 (т,  $J = 2.6$  Гц, 1H, C<sub>6</sub>-H), 3.33 (с, 3H, OMe), 3.77 (т,  $J = 6.6$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H).  $^{13}C$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 11.25, 12.22, 13.11, 15.80, 15.84, 19.30, 21.48, 22.82, 24.14, 24.98, 27.92, 30.59, 31.59, 33.37, 35.12, 35.26, 39.41, 40.31, 42.73, 43.40, 48.01, 52.73, 52.79, 56.46, 56.60, 71.73, 82.43. ВРМС вычислено для  $C_{29}H_{44}D_6O_2$ : 436.4187. Найдено: 436.4193. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 213 (21), 255 (17), 261 (20), 284 (52), 364 (23), 381 (85), 382 (87), 404 (84)  $[M-CH_3OH]^+$ , 405 (84), 419 (20)  $[M+H-H_2O]^+$ , 421 (53)  $[M-CH_3]^+$ , 422 (55), 436 (94)  $[M]^+$ , 437 (100)  $[M+H]^+$ .

**(22R,24R)-[26,27- $^2H_6$ ]3 $\beta$ ,22-Дигидрокси-24-метилхолест-5-ен 64.** К раствору спирта **62** (40 мг, 0.092 ммоль) в смеси диоксан-вода (3 мл, 4:1) прибавили моногидрат толуолсульфо кислоты (10 мг, 0.055 ммоль) и реакционную смесь выдержали 3 часа при 80°C, прибавили триэтиламин (100 мкл, 72.6 мг, 0.718 ммоль), затем растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (8:1  $\Rightarrow$  1:1). Выделено 32 мг (75.8 ммоль, 82%) диола **64**.  $^1H$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.71 (с, 3H, 18-Me), 0.82 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.92 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 28- или 21-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 3.52 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H), 3.74 (ддд, 1H,  $J = 11, 3.3, 1.1$  Гц, C<sub>22</sub>-H), 5.33-5.37 (м, 1H, C<sub>6</sub>-H).  $^{13}C$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 11.86, 12.27, 19.35, 21.06, 24.37, 27.27, 31.63, 31.87, 31.92, 34.07, 34.10, 34.48, 36.48, 37.24, 39.74, 42.27, 42.32, 42.60, 50.14, 53.05, 56.30, 70.98, 71.72, 71.83, 121.55, 140.80. ВРМС вычислено для  $C_{28}H_{42}D_6O_2$ : 422.4031. Найдено: 422.4028. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 191 (45),

213 (36), 217 (32), 229 (19), 255 (14), 269 (32), 284 (53), 287 (32), 302 (100), 303 (26), 313 (9), 372 (8), 405 (30)  $[M+H-H_2O]^+$ , 422 (35)  $[M]^{*+}$ , 423 (38)  $[M+H]^+$ .

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22-Ацетокси-24-метил-6β-метокси-3α,5-цикло-5α-холестан 65.** К раствору спирта **63** (190 мг, 0.435 ммоль) в пиридине (2 мл) прибавили уксусный ангидрид (1 мл, 1.08 г, 10.6 ммоль) и 4-(диметиламино)-пиридин (10 мг, 0.082 ммоль). Реакционную смесь выдержали 12 часов при комнатной температуре, прибавили 20 мл воды и перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Экстрагировали EtOAc (3 раза по 20 мл), объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (10:1 ⇒ 2:1). Выделено 191 мг (0.399 ммоль, 91%) ацетата **65**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.73 (с, 3H, 18-Me), 0.84 (д, *J* = 6.2 Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.96 (д, *J* = 6.6 Гц, 3H, 28- или 21-Me), 1.02 (с, 3H, 19-Me), 2.02 (с, 3H, OAc), 2.76 (т, *J* = 2.9 Гц, 1H, C<sub>6</sub>-H), 3.32 (с, 3H, OMe), 5.06 (м, 1H, C<sub>22</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 12.06, 12.54, 13.07, 15.54, 19.29, 21.30, 21.52, 22.81, 24.13, 24.98, 28.25, 30.56, 31.72, 33.39, 34.98, 35.32, 35.77, 38.23, 38.25, 40.29, 42.70, 43.38, 48.04, 52.71, 56.47, 56.58, 75.02, 82.42, 170.78.

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22-Ацетокси-3β-гидрокси-24-метилхолест-5-ен 66** получен по методике, аналогичной описанной выше для синтеза диола **64**, с выходом 91%. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.69 (с, 3H, 18-Me), 0.84 (д, *J* = 6.6 Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.96 (д, *J* = 7 Гц, 3H, 28- или 21-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 2.03 (с, 3H, OAc), 3.53 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H), 5.01 (м, 1H, C<sub>22</sub>-H), 5.35 (м, 1H, C<sub>6</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.67, 12.60, 19.41, 21.09, 21.35, 24.24, 28.15, 31.64, 31.84, 31.94, 34.99, 35.74, 36.49, 37.26, 38.18, 38.20, 39.74, 42.25, 42.29, 50.10, 52.53, 56.64, 71.74, 75.01, 121.67, 140.72, 170.85. ВРМС вычислено для C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>D<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: 464.4137. Найдено: 464.4155. ЭУ-МС *m/z* (%): 107 (36), 145 (40), 159 (31), 213 (37), 272 (100), 293 (27), 299 (50), 372 (25), 389 (29), 404 (92)  $[M-AcOH]^{*+}$ , 405 (95)  $[M-AcO]^+$ , 446 (24)  $[M-H_2O]^{*+}$ , 447 (32)  $[M+H-H_2O]^+$ , 464 (74)  $[M]^{*+}$ , 465 (52)  $[M+H]^+$ .

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]3β,22-Дигидрокси-24-метилхолест-5-ен 67.** Гидроксиацетат **66** (25 мг, 0.052 ммоль) в растворе гидроксида натрия (10%, 3 мл) выдержали при 70°C в течение 15 мин., прибавили 2М раствор соляной кислоты до нейтральной реакции, и отогнали растворители в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (10:1 ⇒ 1:1). Выделено 21 мг (49.7 мкмоль, 95 %) диола **67**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.70 (с, 3H, 18-Me), 0.81 (д, *J* = 6.2 Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.90 (д, *J* = 6.2 Гц, 3H, 28- или 21-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 3.52 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H), 3.77 (т, *J* = 6.6 Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 5.35 (м, 1H, C<sub>6</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.27, 11.80, 15.77, 15.81, 19.42, 21.11, 24.22, 27.83, 31.66, 31.86, 31.95, 35.13, 36.49, 37.24, 39.38, 39.78, 42.26, 42.29, 42.37, 50.07, 52.55, 56.68, 71.72, 71.78, 121.64, 140.78. ВРМС вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>D<sub>6</sub>O<sub>2</sub>: 422.4031. Найдено: 422.4036. ЭУ-МС *m/z* (%): 95 (23),

107 (21), 215 (13), 217 (9), 233 (15), 248 (10), 274 (100), 285 (8), 301 (50), 391 (10), 406 (37), 407 (40) [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 422 (5) [M]<sup>•+</sup>.

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22-Гидрокси-24-метилхолест-4-ен-3,6-дион 68.** К раствору гидроксиацетата **66** (20 мг, 0.042 ммоль) в ацетоне (5 мл) прибавили реактив Джонса (0.5 мл), и выдержали реакционную смесь в течение 15 мин при комнатной температуре, затем прибавили изопропанол (2 мл). Через 15 мин прибавили 1 мл соляной кислоты (37% раствор), и выдержали 1 час при перемешивании. Затем реакционную смесь разбавили водой (25 мл) и экстрагировали хлороформом (3 раза по 20 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отогнали растворитель в вакууме. Полученный продукт растворили в 10% растворе гидроксида натрия в метаноле (3мл) и кипятили при 70°C в течение 20 мин. Затем прибавили 2М раствор соляной кислоты до нейтральной реакции, и растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (10:1 ⇒ 2:1). Выделено 4.7 мг (0.011 ммоль, 25 %) гидроксиона **68**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.74 (с, 3H, 18-Me), 0.83 (д, J = 6.6 Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.91 (д, J = 6.6 Гц, 3H, 28- или 21-Me), 1.17 (с, 3H, 19-Me), 3.77 (т, J = 7.3 Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 6.17 (д, J = 0.8 Гц, 1H, C<sub>4</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.25, 11.84, 15.83, 17.54, 20.90, 23.91, 27.62, 29.70, 33.97, 34.26, 35.29, 35.51, 39.13, 39.34, 39.47, 39.50, 42.45, 46.76, 50.90, 52.35, 56.46, 71.57, 125.50, 161.00, 199.46, 202.27. ВРМС вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>D<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: 434.3667. Найдено: 434.3669. ЭУ-МС <sup>m/z</sup> (%): 163 (34), 243 (24), 257 (14), 272 (13), 286 (39), 296 (22), 299 (28), 314 (100), 315 (46), 316 (47), 330 (6), 343 (11), 434 (2) [M]<sup>•+</sup>, 435 (3) [M+H]<sup>+</sup>.

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22-Ацетокси-3β-гидрокси-24-метил-5α-холестан 69.** К раствору гидроксиацетата **66** (100 мг, 0.215 ммоль) в этаноле (5 мл) прибавили палладий на угле (5%, 50 мг). Реакционную емкость вакуумировали и наполнили водородом, затем интенсивно перемешивали реакционную смесь в течение 12 часов и отфильтровали через слой силикагеля. Растворитель отогнали в вакууме, остаток хроматографировали на SiO<sub>2</sub> (гексан-EtOAc (8:1 ⇒ 2:1)). Выделено 90 мг (0.193 ммоль, 89 %) спирта **69**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.66 (с, 3H, 18-Me), 0.80 (с, 3H, 19-Me), 0.83 (дд, J = 6.6, 0.7 Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.94 (д, J = 6.6 Гц, 3H, 28- или 21-Me), 2.03 (с, 3H, OAc), 3.59 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H), 5.05 (м, 1H, C<sub>22</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.88, 12.33, 12.52, 15.47, 15.51, 21.26, 21.33, 24.16, 28.16, 28.69, 31.49, 31.68, 32.01, 34.97, 35.44, 35.53, 35.70, 37.01, 38.18, 40.00, 42.51, 44.83, 52.63, 54.33, 56.39, 71.32, 74.99, 170.83.

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22-Гидрокси-24-метил-5α-холест-3-он 70.** К раствору спирта **69** (29 мг, 0.062 ммоль) в ацетоне (3 мл) прибавили реактив Джонса (0.2 мл), выдержали 15 мин при комнатной температуре и прибавили изопропанол (3 мл). Реакционную смесь выдержали 15 мин, разбавили водой (25 мл) и экстрагировали хлороформом (3 раза по 20 мл). Объединенные органические фазы сушили над

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель отогнали в вакууме. Полученный продукт растворили в растворе гидроксида натрия в метаноле (10%, 3мл) и кипятили при 70°C в течение 20 мин. Затем прибавили 2 М раствор соляной кислоты до нейтральной реакции, и отогнали растворитель в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (10:1 ⇒ 2:1). Выделено 19.6 мг (0.046 мкмоль, 74%) гидроксикетона **70**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.70 (с, 3H, 18-Me), 0.83 (д, *J* = 6.6 Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.87 (д, *J* = 6.6 Гц, 3H, 28- или 21-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 3.77 (т, *J* = 7 Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.23, 11.47, 12.01, 15.77, 15.81, 21.47, 24.16, 27.82, 28.94, 31.57, 31.67, 35.25, 35.45, 35.63, 38.18, 38.52, 39.39, 39.90, 42.53, 44.71, 46.65, 52.64, 53.74, 56.21, 71.62, 212.17. ВРМС вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>D<sub>6</sub>O<sub>2</sub>: 422.4031. Найдено: 422.4021. ЭУ-МС *m/z* (%): 163 (25), 203 (16), 217 (22), 232 (98), 246 (25), 271 (7), 273 (8), 287 (19), 302 (100), 313 (8), 316 (5), 331 (6), 421 (34), 422 (24) [M]<sup>•+</sup>.

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]3β,22-Дигидрокси-24-метил-5α-холестан 71** получен из ацетата **69** по методике, аналогичной описанной выше для синтеза соединения **67** с выходом 93%. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.67 (с, 3H, 18-Me), 0.80 (с, 3H, 19-Me), 0.82 (д, *J* = 6.2 Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.88 (д, *J* = 6.2 Гц, 3H, 28- или 21-Me), 3.59 (м, *W*/2 = 22 Гц, 1H, C<sub>3</sub>-H), 3.77 (т, *J* = 6.6 Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 11.21, 12.02, 12.33, 15.77, 15.80, 21.28, 24.15, 27.84, 28.71, 31.52, 32.04, 35.24, 35.46, 35.56, 36.99, 38.20, 39.33, 39.37, 40.04, 42.54, 44.82, 52.67, 54.31, 56.43, 71.34, 71.69. ВРМС вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>D<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: 424.4187. Найдено: 424.4185. ЭУ-МС *m/z* (%): 165 (26), 215 (35), 217 (23), 234 (94), 248 (25), 257 (13), 271 (19), 286 (34), 289 (20), 304 (100), 315 (9), 333 (6), 406 (7) [M-H<sub>2</sub>O]<sup>•+</sup>, 407 (8) [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 424 (53) [M]<sup>•+</sup>.

**(22S,24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]3α,22-Дигидрокси-24-метил-5α-холестан 72.** К раствору спирта **69** (40 мг, 0.086 ммоль) в пиридине (2 мл) прибавили мезилхлорид (0.2 мл, 296 мг, 2.58 ммоль), реакцию смесь выдержали 3 часа при комнатной температуре и разбавили водой (20 мл). Экстрагировали хлороформом (3 раза по 20 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель отогнали в вакууме. К раствору полученного мезилата в диметилформамиде (5 мл) прибавили супероксид калия (230 мг, 3.2 ммоль) и 18-краун-6 (1.0 г, 3.78 ммоль), и перемешивали реакцию смесь в течение 10 часов при комнатной температуре, затем разбавили водой (25 мл) и экстрагировали хлороформом (3 раза по 20 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и отогнали растворитель в вакууме. Полученный продукт растворили в растворе гидроксида натрия в метаноле (10%, 3мл) и кипятили при 70°C в течение 15 мин. Затем прибавили 2 М раствор соляной кислоты до нейтральной реакции, и растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (10:1 ⇒ 1:1). Выделено 23 мг (0.054 ммоль, 63%) диола **72**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.67 (с, 3H, 18-Me), 0.78 (с, 3H, 19-Me), 0.82 (д, *J* = 6.6 Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.88 (д, *J* = 6.2 Гц, 3H, 28- или 21-Me), 3.77 (т, *J* = 6.6 Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 4.04 (м, 1H, *W*/2 = 7 Гц, C<sub>3</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100

МГц)  $\delta$ : 11.19, 11.22, 12.03, 15.80, 20.81, 24.11, 27.83, 28.56, 29.02, 31.97, 32.18, 35.56, 35.90, 36.07, 39.11, 39.30, 39.32, 39.39, 40.05, 42.54, 52.65, 54.29, 56.48, 66.60, 70.64, 71.69. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 165 (31), 215 (42), 217 (28), 234 (93), 248 (28), 257 (15), 271 (25), 286 (56), 289 (23), 304 (100), 315 (13), 333 (4), 389 (5), 406 (12)  $[M-H_2O]^+$ , 407 (14)  $[M+H-H_2O]^+$ , 424 (2)  $[M]^+$ , 425 (2)  $[M+H]^+$ .

**(24S)-[26,27- $^2H_6$ ]22-Ацетокси-24-метил-6-(1,3-диоксолан-2-ил)-23-фенилсульфон-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холестан 73** получен из гидроксисульфона **41** по методике, аналогичной описанной выше для синтеза ацетата **65** с выходом 92%.  $^1H$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.71 (с, 3H, 18-Me), 0.75 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-Me), 0.99 (с, 3H, 19-Me), 1.34 (д,  $J = 7.0$  Гц, 3H, 21-Me), 2.08 (с, 1H, AcO), 3.68-4.03 (м, 4H, диоксолан), 5.52 (д,  $J = 8.9$  Гц, 2H, C<sub>22</sub>-H), 7.20-7.84 (м, 5H, Ph).  $^{13}C$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 7.34, 11.82, 12.45, 13.82, 18.95, 20.88, 21.44, 22.59, 23.08, 24.15, 24.93, 28.49, 33.35, 34.20, 39.11, 39.30, 40.12, 40.13, 42.91, 45.62, 47.41, 52.40, 56.28, 64.68, 64.90, 66.11, 73.57, 109.83, 125.33, 127.12, 128.25, 128.87, 128.91, 129.06, 132.80, 169.31.

**(24R)-[26,27- $^2H_6$ ]24-Метил-6-(1,3-диоксолан-2-ил)-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холест-22-ен 74.** Раствор ацетилсульфона **73** (1.38 г, 2.13 ммоль) в насыщенном растворе гидрофосфата калия в метаноле (80 мл), охладили до 0°C, прибавили амальгаму натрия (7 г, 5% раствор). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 часов до полного растворения амальгамы при 0°C, разбавили водой (80 мл) и экстрагировали гексаном (3 раза по 80 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  4:1). Выделено 710 мг (1.59 ммоль, 74%) олефина **74**.  $^1H$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.73 (с, 3H, 18-Me), 0.91 (д,  $J = 6.7$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 0.99 (д,  $J = 7.0$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 3.70-4.04 (м, 4H, диоксолан), 5.17 (м, 2H, C<sub>22</sub>-H и C<sub>23</sub>-H).  $^{13}C$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 7.36, 12.41, 17.96, 18.99, 21.02, 22.61, 23.13, 24.28, 24.98, 28.81, 33.35, 34.21, 39.38, 40.15, 40.22, 40.32, 42.83, 45.71, 47.64, 56.23, 56.51, 64.67, 64.90, 109.96, 131.98, 136.04.

**Гидроксилирование олефина 74.** К суспензии олефина **74** (700 мг, 1.57 ммоль) в смеси трет-бутанол:вода (5:4, 38 мл) прибавили AD-mix- $\beta$  (5 г), MeSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (490 мг, 5.15 ммоль). Реакционную смесь интенсивно перемешивали в течение 15 дней при комнатной температуре, затем прибавили 10 мл NaHSO<sub>3</sub> (37 % раствор). Выдержали при 35°C в течение 30 мин и упарили в вакууме до сухого остатка, который затем растворили в воде (60 мл). Экстрагировали хлороформом (3 раза по 50 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (15:1  $\Rightarrow$  2:1). Выделено в порядке элюирования:

**(22S,23S,24S)-[26,27- $^2H_6$ ]24-метил-6-(1,3-диоксолан-2-ил)-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холест-22,23-диол 75** с выходом 29%.  $^1H$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.75 (с, 3H, 18-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 1.04 (д,  $J = 7.0$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 3.45 (д,  $J = 9.2$  Гц, 1H,



C<sub>22</sub>-H), 3.68 (д,  $J = 4.5$  Гц, 1H, C<sub>23</sub>-H), 3.72-4.05 (м, 4H, диоксолан). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 7.30, 10.16, 12.07, 14.11, 18.96, 22.55, 23.08, 24.41, 24.92, 25.99, 27.87, 33.25, 34.14, 39.24, 40.09, 40.21, 42.38, 43.38, 45.60, 47.41, 52.89, 55.89, 64.63, 64.92, 71.18, 71.57, 109.87.

**(22R,23R,24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]24-метил-6-(1,3-диоксолан-2-ил)-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холест-22,23-диол 76** с выходом 53%. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 0.85 (д,  $J = 6.8$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 0.90 (д,  $J = 6.3$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 3.56 (д,  $J = 7.6$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.71 (д,  $J = 8.0$  Гц, 1H, C<sub>23</sub>-H), 3.72-4.06 (м, 4H, диоксолан). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 7.30, 10.14, 11.93, 12.11, 18.98, 22.60, 23.10, 24.06, 24.91, 27.85, 30.33, 33.24, 34.21, 36.87, 39.25, 40.17, 40.20, 42.69, 45.61, 47.39, 52.51, 56.20, 64.65, 64.89, 73.47, 74.87, 109.91.

**(22R,23R,24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22,23-Дигидрокси-24-метил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холест-6-он 77.** К раствору диола **76** (400 мг, 0.833 ммоль) в метаноле (40 мл) прибавили воду (1 мл) и пиридиний тозилат (40 мг, 0.159 ммоль). Реакционную смесь выдержали 1 час при комнатной температуре и отогнали растворитель в вакууме. Полученный остаток разбавили водой (50 мл) и экстрагировали хлороформом (3 раза по 50 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-ЕтОAc (10:1  $\Rightarrow$  1:1). Выделено 350 мг (0.801 ммоль, 96%) кетодиола **77**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 0.85 (д,  $J = 6.7$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 0.92 (д,  $J = 6.7$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 3.56 (дд,  $J = 8.0, 1.4$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.70 (дд,  $J = 8.4, 1.1$  Гц, 1H, C<sub>23</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 10.05, 10.07, 11.71, 12.00, 19.69, 22.96, 23.99, 25.95, 27.81, 30.42, 33.57, 34.97, 35.31, 37.03, 39.86, 42.64, 44.78, 46.18, 46.40, 46.81, 52.48, 56.98, 73.62, 74.73, 209.43.

**(22R,23R,24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22,23-Диацетокси-24-метил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холест-6-он 78** получен из кетодиола **77** с выходом 96% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза ацетата **65**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.75 (с, 3H, 18-Me), 0.96 (д,  $J = 6.5$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 1.01 (с, 3H, 19-Me), 1.03 (д,  $J = 7.0$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 2.00 (с, 1H, AcO), 2.02 (с, 1H, AcO), 5.16 (д,  $J = 9.3$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 5.32 (д,  $J = 8.7$  Гц, 1H, C<sub>23</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 11.03, 11.06, 11.65, 11.85, 12.84, 19.68, 20.89, 20.96, 22.85, 23.93, 25.89, 28.18, 29.93, 33.47, 34.79, 35.33, 36.95, 39.65, 42.57, 44.64, 45.99, 46.29, 46.71, 52.32, 56.88, 74.18, 75.76, 170.57, 209.57.

**(22R,23R,24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22,23-Диацетокси-3 $\beta$ -гидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холест-6-он 79.** К раствору диацетата **78** (23 мг, 0.044 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (0.8 мл, 839 мг, 13.9 ммоль) прибавили раствор серной кислоты (3M, 20 мкл). Реакционную смесь выдержали при 115°C в течение 100 мин, разбавили водой (15 мл) и экстрагировали хлороформом (3 раза по 15 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель отогнали в вакууме. Полученный продукт растворили в растворе гидроксида калия в метаноле (2%

раствор, 2 мл), выдержали 2 часа при комнатной температуре, разбавили водой (15 мл) и экстрагировали хлороформом (3 раза по 15 мл). Объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , и растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , гексан- $\text{EtOAc}$  (10:1  $\Rightarrow$  1:1). Выделено 16 мг (0.030 ммоль, 67 %) гидроксиацетата **79**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.69 (с, 3H, 18- или 19-Ме), 0.76 (с, 3H, 18- или 19-Ме), 0.95 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-или 28-Ме), 1.02 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-или 28-Ме), 1.99 (с, 1H, AcO), 2.02 (с, 1H, AcO), 3.58 (м, 1H,  $\text{C}_3\text{-H}$ ) 5.16 (д,  $J = 9.1$  Гц, 1H,  $\text{C}_{22}\text{-H}$ ), 5.31 (д,  $J = 8.8$  Гц, 1H,  $\text{C}_{23}\text{-H}$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 11.03, 11.06, 11.84, 12.82, 13.15, 20.91, 20.96, 21.50, 23.87, 28.09, 30.02, 30.68, 36.68, 36.95, 37.89, 39.44, 40.91, 42.83, 46.58, 52.39, 53.84, 56.64, 56.76, 70.62, 74.17, 75.77, 170.54, 170.59, 210.69.

**(22R,23R,24S)-[26,27- $^2\text{H}_6$ ]3 $\beta$ ,22,23-Тригидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холест-6-он 80, теастерон** получен из ацетата **79** с выходом 88% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза соединения **67**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.69 (с, 3H, 18-Ме), 0.76 (с, 3H, 19-Ме), 0.84 (д,  $J = 6.8$  Гц, 3H, 21-или 28-Ме), 0.91 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-или 28-Ме), 2.22 (дд,  $J = 12.7, 2.5$  Гц, 1H), 2.32 (дд,  $J = 12.9, 4.3$  Гц, 1H,  $\text{C}_7\text{-}\beta\text{H}$ ), 3.49-3.65 (м, 2H,  $\text{C}_3\text{-H}$  и  $\text{C}_{22}\text{-H}$ ), 3.72 (д,  $J = 8.4$  Гц, 1H,  $\text{C}_{23}\text{-H}$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 10.08, 10.11, 11.92, 11.95, 13.16, 21.56, 23.86, 27.66, 30.03, 30.69, 36.65, 36.82, 37.97, 39.53, 40.96, 42.82, 46.66, 52.34, 53.85, 56.64, 56.77, 70.65, 73.56, 74.70, 210.89.

**(22R,23R,24S)-[26,27- $^2\text{H}_6$ ]3 $\beta$ -Бром-22,23-дигидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холест-6-он 81.** К раствору кетодиола **77** (290 мг, 0.665 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (10 мл) прибавили раствор бромоводорода (48% раствор, 1 мл, 5.9 ммоль). Реакционную смесь выдержали 30 мин при комнатной температуре, разбавили водой (50 мл) и прибавили бикарбонат натрия до нейтральной реакции. Экстрагировали этилацетатом (3 раза по 50 мл). Объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , гексан- $\text{EtOAc}$  (10:1  $\Rightarrow$  1:1). Выделено 322 мг (0.622 ммоль, 93%) бромдиола **81**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.68 (с, 3H, 18-Ме), 0.80 (с, 3H, 19-Ме), 0.84 (д,  $J = 6.8$  Гц, 3H, 21-или 28-Ме), 0.90 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-или 28-Ме), 2.32 (дд,  $J = 13.2, 4.4$  Гц, 1H,  $\text{C}_7\text{-}\beta\text{H}$ ), 3.56 (д,  $J = 9.3$  Гц, 1H,  $\text{C}_{22}\text{-H}$ ), 3.71 (д,  $J = 8.3$  Гц, 1H,  $\text{C}_{23}\text{-H}$ ), 3.94 (м, 1H,  $\text{C}_3\text{-H}$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 10.07, 10.10, 11.89, 11.92, 11.94, 13.11, 21.34, 23.81, 27.62, 32.34, 33.38, 36.81, 37.86, 39.14, 39.42, 40.70, 42.80, 46.53, 50.54, 52.32, 53.75, 56.58, 58.95, 73.56, 74.67, 209.72.

**Ацетонид (22R,23R,24S)-[26,27- $^2\text{H}_6$ ]3 $\beta$ -бром-22,23-дигидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холест-6-она 82.** К раствору бромдиола **81** (320 мг, 0.618 ммоль) в ацетоне (30 мл) прибавили 2,2-диметоксипропан (1 мл, 847 мг, 8.13 ммоль) и пиридиний тозилат (40 мг, 0.159 ммоль). Реакционную смесь выдержали 1 час при комнатной температуре, и отогнали растворитель в вакууме. Полученный остаток разбавили

водой (30 мл) и экстрагировали хлороформом (3 раза по 30 мл). Объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , гексан- $\text{EtOAc}$  (10:1  $\Rightarrow$  3:1). Выделено 309 мг (0.554 ммоль, 89%) бромацетонида **82**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.67 (с, 3H, 18-Me), 0.80 (с, 3H, 19-Me), 0.89 (д,  $J = 6.8$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 0.98 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 1.34 (с, 3H, Me), 1.37 (с, 3H, Me), 2.32 (дд,  $J = 13.2, 4.4$  Гц, 1H,  $\text{C}_7\text{-}\beta\text{H}$ ), 3.73 (дд,  $J = 8.5, 4.3$  Гц, 1H,  $\text{C}_{22}\text{-H}$ ), 3.83 (д,  $J = 8.6$  Гц, 1H,  $\text{C}_{23}\text{-H}$ ), 3.94 (м, 1H,  $\text{C}_3\text{-H}$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 9.95, 9.97, 11.77, 12.64, 13.11, 21.33, 23.83, 27.27, 27.79, 30.17, 32.35, 33.39, 36.16, 37.87, 39.14, 39.19, 40.71, 42.93, 46.56, 50.56, 53.38, 53.79, 56.45, 58.94, 79.16, 80.44, 107.57, 209.67.

Ацетонид (22*R*,23*R*,24*S*)-[26,27- $^2\text{H}_6$ ]22,23-дигидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холест-2-ен-6-она **83** получен из бромацетонида **82** с выходом 72% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза енона **47**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.68 (с, 3H, 18-Me), 0.72 (с, 3H, 19-Me), 0.89 (д,  $J = 7.0$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 0.99 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 1.35 (с, 3H, Me), 1.37 (с, 3H, Me), 3.73 (дд,  $J = 8.1, 4.1$  Гц, 1H,  $\text{C}_{22}\text{-H}$ ), 3.83 (д,  $J = 8.4$  Гц, 1H,  $\text{C}_{23}\text{-H}$ ), 5.55-5.72 (м, 2H,  $\text{C}_2\text{-H}$  и  $\text{C}_3\text{-H}$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 9.95, 9.97, 11.70, 12.66, 13.53, 21.14, 21.72, 23.85, 27.27, 27.81, 30.17, 36.18, 37.79, 39.29, 39.34, 40.06, 40.50, 42.78, 46.99, 53.36, 53.40, 53.82, 56.51, 79.16, 80.46, 107.56, 124.52, 124.94, 211.97.

Ацетонид (22*R*,23*R*,24*S*)-[26,27- $^2\text{H}_6$ ]22,23-дигидрокси-24-метил-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -эпокси-5 $\alpha$ -холест-6-она **84**. К раствору енона **83** (170 мг, 0.356 ммоль) в хлороформе (6 мл) прибавили мета-хлорнадбензойную кислоту (161 мг, 0.936 ммоль). Реакционную смесь выдержали в течение 90 мин при комнатной температуре, затем последовательно обработали растворами карбоната натрия и гидросульфита натрия. Экстрагировали хлороформом (3 раза по 25 мл). Объединенные органические фазы сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на  $\text{SiO}_2$ , гексан- $\text{EtOAc}$  (10:1  $\Rightarrow$  3:1). Выделено 120 мг (244 ммоль, 68%) эпоксиацетонида **84**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.66 (с, 3H, 18-Me), 0.71 (с, 3H, 19-Me), 0.88 (д,  $J = 7.0$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 0.98 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 1.34 (с, 3H, Me), 1.36 (с, 3H, Me), 2.32 (дд,  $J = 13.3, 4.3$  Гц, 1H), 2.37 (дд,  $J = 11.7, 4.3$  Гц, 1H), 3.12 (дд,  $J = 5.5, 4.0$  Гц, 1H,  $\text{C}_2\text{-H}$ ), 3.26 (м, 1H,  $\text{C}_3\text{-H}$ ), 3.72 (дд,  $J = 12.4, 4.4$  Гц, 1H,  $\text{C}_{22}\text{-H}$ ), 3.82 (д,  $J = 8.4$  Гц, 1H,  $\text{C}_{23}\text{-H}$ ).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 9.95, 9.97, 11.66, 12.64, 15.04, 21.05, 21.10, 23.83, 27.27, 27.76, 30.19, 36.17, 37.57, 37.89, 38.45, 39.20, 40.49, 42.71, 46.90, 49.90, 50.13, 52.36, 53.11, 53.38, 56.35, 79.13, 80.41, 107.56, 211.36.

(24*R*)-[26,27- $^2\text{H}_6$ ]24-Метил-3,6-ди(1,3-диоксолан-2-ил)-5 $\alpha$ -холест-22-ен **85** получен из гидроксисульфона **55** с выходом 57% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза олефина **74** из гидроксисульфона **41**.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.69 (с, 3H, 18-Me), 0.90 (д,  $J = 6.8$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 0.95 (с, 3H, 19-

Me), 0.99 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 3.70-3.79 (м, 1H, диоксолан), 3.85-3.98 (м, 1H, диоксолан), 5.17 (м, 2H, C<sub>22</sub>-H и C<sub>23</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 12.30, 13.55, 17.90, 17.95, 21.00, 21.13, 24.29, 28.73, 29.34, 31.13, 33.51, 36.95, 37.36, 39.84, 40.17, 40.20, 41.30, 42.62, 49.70, 53.54, 56.14, 56.23, 64.14, 64.19, 64.30, 65.45, 109.78, 109.84, 131.98, 136.03.

**Гидроксилирование олефина 85** проведено по методике, аналогичной описанной выше для гидроксилирования олефина 74. Выделено в порядке элюирования:

**(24R)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]24-метил-3,6-ди(1,3-диоксолан-2-ил)-5 $\alpha$ -холест-22,23-дион 86** с выходом 5%. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.74 (с, 3H, 18-Me), 0.95 (с, 3H, 19-Me), 0.98 (д,  $J = 6.9$  Гц, 3H, 28- или 21-Me), 1.07 (д,  $J = 7.0$  Гц, 3H, 28- или 21-Me), 3.70-3.79 (м, 1H, диоксолан), 3.85-3.99 (м, 1H, диоксолан). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 11.90, 12.33, 13.54, 16.31, 21.01, 24.50, 27.51, 28.94, 29.27, 31.05, 33.39, 36.87, 37.27, 39.66, 40.97, 41.21, 43.06, 49.58, 51.89, 53.32, 55.23, 64.13, 64.21, 64.30, 65.43, 109.64, 109.68, 202.54.

**(22S,23S,24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]24-метил-3,6-ди(1,3-диоксолан-2-ил)-5 $\alpha$ -холест-22,23-диол 87** с выходом 39%. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.71 (с, 3H, 18-Me), 0.75 (д,  $J = 6.9$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 0.95 (с, 3H, 19-Me), 1.03 (д,  $J = 6.9$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 3.45 (д,  $J = 8.8$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.67 (д,  $J = 4.4$  Гц, 1H, C<sub>23</sub>-H), 3.70-3.79 (м, 1H, диоксолан), 3.86-3.98 (м, 1H, диоксолан). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 10.13, 10.15, 11.97, 13.54, 14.13, 21.05, 24.44, 25.97, 27.78, 29.27, 31.03, 33.42, 36.85, 37.26, 39.78, 41.21, 41.59, 42.33, 43.18, 49.60, 52.84, 53.30, 55.61, 64.13, 64.21, 64.28, 65.41, 71.21, 71.58, 109.71.

**(22R,23R,24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]24-метил-3,6-ди(1,3-диоксолан-2-ил)-5 $\alpha$ -холест-22,23-диол 88** с выходом 52%. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.70 (с, 3H, 18-Me), 0.84 (д,  $J = 6.9$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 0.90 (д,  $J = 6.8$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 0.95 (с, 3H, 19-Me), 3.55 (д,  $J = 7.8$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.70 (д,  $J = 8.2$  Гц, 1H, C<sub>23</sub>-H), 3.72-3.79 (м, 1H, диоксолан), 3.86-3.98 (м, 1H, диоксолан). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 10.11, 10.14, 11.91, 11.99, 13.56, 21.08, 24.07, 27.79, 29.25, 30.32, 31.06, 33.49, 36.84, 36.90, 37.25, 39.88, 39.94, 41.18, 42.48, 49.57, 52.46, 53.30, 55.96, 64.13, 64.19, 64.30, 65.44, 73.42, 74.83, 109.71, 109.74.

**Ацетонид (22R,23R,24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22,23-дигидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холест-3,6-диола 89.** К раствору диола 88 (105 мг, 0.194 ммоль) в ацетоне (9 мл) прибавили соляную кислоту (1M, 3 мл, 3 ммоль). Реакционную смесь выдержали 8 часов при комнатной температуре, нейтрализовали избыток кислоты добавлением пиридина, и отогнали растворитель в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (15:1  $\Rightarrow$  4:1). Выделено 75 мг (152 мкмоль, 78%) ацетонида 89. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.70 (с, 3H, 18-Me), 0.89 (д,  $J = 6.9$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 0.96 (с, 3H, 19-Me), 0.99 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-или 28-Me), 1.34 (с, 3H, Me), 1.37 (с, 3H, Me),

3.73 (дд,  $J = 8.4, 4.0$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.83 (д,  $J = 8.4$  Гц, 1H, C<sub>23</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 9.95, 9.97, 11.78, 12.58, 12.65, 21.69, 23.89, 27.27, 27.80, 30.18, 36.17, 36.97, 37.36, 38.04, 38.08, 39.17, 40.49, 41.25, 42.96, 46.58, 53.38, 53.41, 56.37, 57.45, 79.14, 80.40, 107.58, 209.04, 211.15.

**(24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]24-метил-6 $\beta$ -метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холест-22-ен 90.** К раствору гидроксисульфона **59** (600 мг, 1.04 ммоль) в метиленхлориде (30 мл) прибавили пиридин (100 мкл, 97.8 мг, 1.24 ммоль), ацетилхлорид (87.5 мкл, 96.6 мг, 1.23 ммоль) и 4-(диметиламино)-пиридин (5 мг, 40.9 мкмоль). Реакционную смесь выдержали 8 часов при комнатной температуре и разбавили водой (30 мл). Затем отделили органическую фазу, а водную экстрагировали с CHCl<sub>3</sub> (3 раза по 30 мл). Объединенные органические фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и отогнали растворитель в вакууме. К охлажденному до 0 °С раствору полученного продукта в метаноле (100 мл) прибавили магний (1 г, 41.1 ммоль) и хлорид ртути (II) (400 мг, 1.47 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 60 мин при 0 °С, профильтровали через слой SiO<sub>2</sub>. Фильтрат разбавили водой (50 мл) и экстрагировали гексаном (3 раза по 50 мл). Объединенные гексановые фазы сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворитель отогнали в вакууме. Хроматографировали на SiO<sub>2</sub>, гексан-EtOAc (20:1  $\Rightarrow$  10:1). Выделено 210 мг (0.502 ммоль, 48.3%) олефина **90**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.73 (с, 3H, 18-Me), 0.91 (д,  $J = 6.6$  Гц, 21- или 28-Me), 1.00 (д,  $J = 7$  Гц, 3H, 28- или 21-Me), 1.03 (с, 3H, 19-Me), 2.76 (т,  $J = 2.7$  Гц, 1H, C<sub>6</sub>-H), 3.32 (с, 3H, OMe), 5.15-5.19 (м, 2H, C<sub>22</sub>- и C<sub>23</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 12.49, 13.14, 17.94, 17.99, 19.32, 21.03, 21.60, 22.83, 24.29, 25.03, 28.89, 30.58, 32.81, 33.47, 35.17, 40.25, 40.31, 42.78, 43.00, 43.50, 48.23, 56.30, 56.57, 56.76, 82.54, 131.94, 136.12. ВРМС вычислено для C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>D<sub>6</sub>O: 418.4082. Найдено: 418.4090. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 81 (46), 107 (36), 159 (31), 161 (23), 253 (31), 255 (100), 285 (17), 314 (23), 363 (78), 364 (77), 386 (68) [M-CH<sub>3</sub>OH]<sup>•+</sup>, 387 (69), 403 (45) [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 404 (48), 418 (91) [M]<sup>•+</sup>, 419 (98) [M+H]<sup>+</sup>.

**Гидроксилирование олефина 90** проведено по методике, аналогичной описанной выше для гидроксилирования олефина **74**. Выделено в порядке элюирования:

**(22S,23S,24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]24-метил-6 $\beta$ -метокси-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -холест-22,23-диол 91** с выходом 22%. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц)  $\delta$ : 0.75 (д,  $J = 6.4$  Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.76 (с, 3H, 18-Me), 1.03 (с, 3H, 19-Me), 1.04 (д,  $J = 7$  Гц, 3H, 28- или 21-Me), 2.77 (т,  $J = 2.7$  Гц, 1H, C<sub>6</sub>-H), 3.32 (с, 3H, OMe), 3.46 (д,  $J = 9$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.67 (д,  $J = 4.4$  Гц, 1H, C<sub>23</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц)  $\delta$ : 10.22, 12.21, 13.15, 14.18, 19.28, 21.54, 21.61, 22.84, 24.48, 25.02, 26.15, 28.04, 30.59, 33.45, 35.17, 35.36, 40.37, 42.42, 43.40, 43.46, 48.13, 53.09, 56.26, 56.58, 71.43, 71.75, 82.47. ВРМС вычислено для C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>D<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: 452.4137. Найдено: 452.4137. ЭУ-МС  $m/z$  (%): 159 (48), 161 (39), 213 (40), 227 (25), 253 (29), 255 (45), 295 (52), 313 (100), 331 (13), 346 (30), 297 (24), 298

(28), 420 (28)  $[M-CH_3OH]^+$ , 421 (30)  $[M+H-CH_3OH]^+$ , 437 (13)  $[M-CH_3]^+$ , 438 (15), 452 (58)  $[M]^+$ , 453 (20)  $[M+H]^+$

**(22R,23R,24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]24-метил-6β-метокси-3α,5-цикло-5α-холест-22,23-диол 92** с выходом 51%. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.74 (с, 3H, 18-Me), 0.85 (д, *J* = 7 Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.91 (д, *J* = 6.6 Гц, 3H, 28- или 21-Me), 1.03 (с, 3H, 19-Me), 2.77 (т, *J* = 2.9 Гц, 1H, C<sub>6</sub>-H), 3.33 (с, 3H, OMe), 3.57 (дд, *J* = 8.1, 1.1 Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.70 (ддд, *J* = 8.1, 2.2, 1.1 Гц, 1H, C<sub>23</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 10.07, 10.09, 11.97, 12.22, 13.15, 19.30, 21.56, 22.87, 24.11, 25.01, 26.98, 27.96, 30.43, 30.68, 33.45, 35.18, 37.03, 40.43, 42.72, 43.46, 48.10, 52.72, 56.53, 56.60, 73.61, 74.93, 82.50. ВРМС вычислено для C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>D<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: 452.4137. Найдено: 452.4135. ЭУ-МС <sup>m/z</sup> (%): 107 (25), 121 (25), 159 (18), 213 (16), 227 (20), 255 (25), 295 (48), 313 (100), 331 (11), 346 (33), 297 (27), 298 (28), 420 (17)  $[M-CH_3OH]^+$ , 421 (17), 437 (16)  $[M-CH_3]^+$ , 438 (16), 452 (74)  $[M]^+$ , 453 (38)  $[M+H]^+$ .

**(22R,23R,24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]3β,22,23-тригидрокси-24-метил-5α-холест-5-ен 93** получен из диола **92** с выходом 88% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза диола **64**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 0.81 (с, 3H, 18-Me), 1.06 (с, 3H, 19-Me), 1.16 (д, *J* = 6.6 Гц, 21- или 28-Me), 1.27 (д, *J* = 6.6 Гц, 3H, 28- или 21-Me), 3.86 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H), 3.99 (дд, *J* = 8.4, 1.1 Гц, C<sub>22</sub>-H), 4.14 (м, 1H, C<sub>23</sub>-H), 5.40-5.44 (м, 1H, C<sub>6</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) δ: 10.90, 10.92, 12.00, 12.84, 19.67, 21.47, 24.53, 28.42, 30.89, 32.27, 32.65, 36.92, 37.84, 38.15, 40.34, 41.05, 42.41, 43.52, 50.55, 53.11, 57.16, 71.30, 73.11, 74.41, 121.24, 141.99. ВРМС вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>D<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: 438.3980. Найдено: 438.3982. ЭУ-МС <sup>m/z</sup> (%): 159 (23), 213 (20), 255 (30), 273 (15), 295 (31), 313 (70), 332 (100), 361 (3), 421 (3)  $[M+H-H_2O]^+$ , 438 (26)  $[M]^+$

**(22R,23R,24S)-[26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]3β,22,23-тригидрокси-24-метил-5α-холестан 94** получен из энтриола **93** с выходом 96% по методике, аналогичной описанной выше для синтеза диола **69**. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц) δ: 0.67 (с, 3H, 18-Me), 0.81 (с, 3H, 19-Me), 0.84 (д, *J* = 7 Гц, 3H, 21- или 28-Me), 0.89 (д, *J* = 6.2 Гц, 3H, 28- или 21-Me), 3.54-3.64 (м, 2H, C<sub>3</sub>- и C<sub>22</sub>-H), 3.72 (м, 1H, C<sub>23</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц) δ: 10.08, 10.10, 11.87, 11.99, 12.32, 21.27, 24.06, 27.83, 28.68, 31.50, 31.98, 35.56, 36.84, 36.96, 38.19, 40.04, 42.44, 44.78, 52.49, 54.25, 56.37, 71.33, 73.46, 74.88. ВРМС вычислено для C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>D<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: 440.4137. Найдено: 440.4133. ЭУ-МС <sup>m/z</sup> (%): 161 (15), 234 (26), 257 (41), 273 (15), 297 (23), 315 (63), 334 (100), 345 (3), 364 (2), 440 (6)  $[M]^+$ .

**(22R,23R,24S)-[26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]22,23-дигидрокси-24-метил-5α-холест-2-ен-6-он 96, секастерол.** (22R,23R,24S)-[26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]22,23-диацетокси-24-метил-5α-холест-2-ен-6-он **95** (1.53 мг, 2.96 мкмоль) [229] в растворе метилата натрия (138 мкл, 48.7 мкмоль, приготовленный из Na (73 мг) и MeOH (9 мл)) перемешивали при комнатной температуре. Через 7 дней, продукт выделили из реакционной смеси методом ВЭЖХ на обращено-фазовой колонке (ацетонитрил-вода). Выделено 1.15 мг (2.65 мкмоль, 92%) секастерола **95**. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц) δ: 0.70 (с, 3H, 19-Me или 18-Me), 0.72 (с,

3H, 18-Me или 19-Me), 0.85 (дд,  $J = 6.9, 1.0$  Гц, 3H, 28-Me), 0.92 (д,  $J = 6.8$  Гц, 3H, 21-Me), 0.95 (д,  $J = 6.8$  Гц, 3H, 26-Me или 27-Me), 0.97 (д,  $J = 6.8$ , 3H, 27-Me или 26-Me), 1.23 (м, 1H, C<sub>24</sub>-H), 1.51 (м, 1H, C<sub>20</sub>-H), 2.00 (м, C<sub>1</sub>-H и C<sub>4</sub>-H), 3.56 (дд,  $J = 1.5, 8.4$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.71 (дм,  $J = 8.4$  Гц, 1H, C<sub>23</sub>-H), 5.56 (м, 1H, C<sub>2</sub>-H или C<sub>3</sub>-H), 5.68 (м, 1H, C<sub>2</sub>-H или C<sub>3</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц)  $\delta$ : 10.10, 10.12, 11.86, 11.92, 13.53, 20.68, 21.15, 21.71, 23.82, 27.64, 30.54, 36.79, 37.77, 39.33, 39.51, 39.98, 40.06, 42.66, 46.96, 52.32, 53.31, 53.82, 56.63, 73.55, 74.76, 124.51, 124.95, 212.05. ГХ-МС (метилборат, 70 eV)  $m/z$  (%): 107 (52), 121 (38), 158 (33), 211 (14), 229 (22), 253 (6), 283 (10), 430 (30) [M-CO]<sup>+</sup>, 440 (19), 443 (100) [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 458 (61) M<sup>•+</sup>.

**(22R,23R,24S)-[26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]2 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,22,23-Тетрагидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холестан-6-он 98, 2-эпикастастерон.** К раствору диэписекастерона **97** (5.3 мг, 11.8 мкмоль) [229] в смеси тетрагидрофуран-вода (4.5 мл, 8:1) прибавили серную кислоту (40 мкл, 2.5М раствор). Реакционную смесь выдержали в течение 15 мин при комнатной температуре и упарили. Продукт выделили методом ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке (ацетонитрил-вода). Выделено 4.1 мг (8.8 мкмоль, 71%) 2-эпикастастерона **97**. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц)  $\delta$ : 0.69 (с, 3H, 18-Me), 0.85 (д,  $J = 6.9$  Гц, 3H, 28-Me), 0.91 (д,  $J = 6.6$  Гц, 3H, 21-Me), 0.95 (д,  $J = 6.9$  Гц, 3H, 27-Me или 26-Me), 0.96 (д,  $J = 6.5$  Гц, 3H, 26-Me или 27-Me), 0.97 (с, 3H, 19-Me), 1.10 и 1.57 (C<sub>15</sub>-H), 1.22 (C<sub>24</sub>-H), 1.26 и 1.97 (C<sub>16</sub>-H), 1.28 и 1.76 (C<sub>12</sub>-H), 1.31 (C<sub>14</sub>-H), 1.33 (C<sub>9</sub>-H), 1.34 и 1.64 (C<sub>11</sub>-H), 1.50 (C<sub>20</sub>-H), 1.58 (C<sub>17</sub>-H), 1.61 (C<sub>25</sub>-H), 1.70 и 2.07 (C<sub>1</sub>-H), 1.76 и 2.02 (C<sub>4</sub>-H), 1.81 (C<sub>8</sub>-H), 2.00 и 2.31 (C<sub>7</sub>-H), 2.74 (дд,  $J = 2.3, 12.9$  Гц, 1H, C<sub>5</sub>-H), 3.56 (д,  $J = 8.5$  Гц, 1H, C<sub>22</sub>-H), 3.72 (д,  $J = 8.5$  Гц, 1H, C<sub>23</sub>-H), 3.93 (м, 1H, C<sub>2</sub>-H), 3.98 (м, 1H, C<sub>3</sub>-H). <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц)  $\delta$ : 10.1 (C-28), 11.9 (C-21), 12.0 (C-18), 15.3 (C-19), 20.7 и 20.8 (C-26 и C-27), 21.2 (C-11), 23.3 (C-1), 23.8 (C-15), 27.7 (C-16), 30.5 (C-25), 36.8 (C-20), 37.4 (C-8), 39.4 и 39.6 (C-4 и C-12), 40.0 (C-24), 41.0 (C-10), 42.8 (C-13), 46.6 (C-7), 51.5 (C-5), 52.3 (C-17), 54.5 (C-9), 56.6 (C-14), 69.7 (C-3), 70.5 (C-2), 73.5 (C-23), 74.7 (C-22), 212.5 (C-6).

## ВЫВОДЫ

Химический синтез рассматриваемых в диссертационной работе соединений был неразрывно сопряжен с использованием современных физико-химических методов установления структуры органических соединений: <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР-, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии. Комплексный анализ полученных данных в сопоставлении с литературными данными позволяет описать протекание исследованных химических реакций и сделать выводы о структуре синтезированных соединений, включая характеристику пространственного расположения функциональных группировок в изучаемых молекулах.

### 3.2. Исследование биосинтеза brassinosterоидов

Перед проведением экспериментов металлическое и стеклянное оборудование подвергалось термической обработке в термостате (Memmert SE 400) при 140÷200°C в течение 2÷5 ч. Стеклянное и пластиковое оборудование подвергалось стерилизации в автоклаве (H+P Varioklav Dampfsterilisator). Для постоянного перемешивания питательной среды использовали шейкер (Infors AG TR 150). Экстракция brassinosterоидов из растительного материала проводилась с помощью роторного гомогенизатора (Ultra-Turrax 316SS, ротор E-04720) при скорости вращения вала 20500 оборотов в минуту. Обработка образцов ультразвуком проводилась в ультразвуковой бане (Bandelin Sonogex RK100) при комнатной температуре. Разрушение суспензий проводилось с использованием центрифуги (Beckman Avanti J-25). Хроматографическое выделение метаболитов проводилось методами:

ТСХ на стеклянных пластинах для препаративной хроматографии Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (VWR, лот №05744) размером 20x20 см с толщиной слоя силикагеля 0.5 мм;

ВЭЖХ на химической станции Agilent 1100 (Agilent Technology) оборудованной дегазатором (G1322A), бинарным насосом (G1312A), устройством автоматического ввода проб (G1313A), термостатом (G1316A), диодно-матричным детектором (G1315B), флуоресцентным детектором (G1321A) и обращеннофазовой колонкой LiChrospher® 100 RP-18 (250×10 мм, диаметр частиц 10 мкм, VWR)

Масс-спектрометрический анализ проводился методами:

ГХ-МС на хроматомассе ThermoQuest CE Instruments TraceGC-2000 (Finnigan), с ионизацией образцов методом электронного удара при 70eV, оборудованном капиллярной колонкой DB-5MS (0.25 мм×15 м, 0.25 мкм толщина фазы, J&W Scientific);

ВЭЖХ на химической станции Agilent 1100, описанной выше, оборудованной обращено-фазовой колонкой Nucleodur 100-3 C18 (100 мм × 1 мм, диаметр частиц 3 мкм, Macherey-Nagel), в комплексе с Micromass Quattro II масс-спектрометром (Micromass) в режиме положительных ионов с ионизацией образцов методом (ESI, Electrospray Ionization) распыления электронов.

[26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]Брассинолид и [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]кастастерон были получены в группе Г. Адама (Галле, Германия)

**Приготовление растительного материала *Arabidopsis thaliana* C24.** 100 мл конические колбы, содержащие стерильные семена (около 30 штук) и 30 мл стерильной среды В5 при рН=5.5 (Таблица 3.1) [292], были помещены на шейкер (90 оборотов в минуту). Проращивание семян проводили при 23°C и постоянном освещении (15 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>). Через 20÷30 дней полученный растительный материал использовали для экспериментов. В каждом эксперименте использовали от 3 до 6 колб, что составляло 12÷30 г свежего растительного материала.



Таблица 3.1

**Состав питательной среды В5**

<b>Компоненты</b>	<b>Концентрация (мг/л)</b>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	150
KNO <sub>3</sub>	2500
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	150
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
KI	0.75
Никотиновая кислота	1
Тиамин гидрохлорид (В <sub>1</sub> )	10
Пиридоксин гидрохлорид (В <sub>6</sub> )	1
мио-Инозитол	100
Трилон Б	37.3
Сахароза	20000

**Приготовление растительного материала *Lycopersicum esculentum*.** Клеточную суспензию *Lycopersicum esculentum* L. сорт Тамина выращивали в среде Линсмайер-Скуг при pH=6 (Таблица 3.2) [293] в 300 мл конических колбах содержащих 100 мл суспензии при 23°C, постоянном перемешивании с помощью шейкера (85 оборотов в минуту) и постоянном освещении (4.4 мкмоль м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>). Исходная культура для пересева (приблизительно 40 мл) использовалась каждые 14 дней. В каждом эксперименте использовалось 55÷60 г свежего растительного материала.

**Приготовление растительного материала *Secale cereale*.** Растительный материал *Secale cereale* сортов “Sorom” и “Petka” (Lochow-Petkus GmbH, Берген-Волд, Германия) выращивали в теплице, используя коробки со смесью вермикулит-песок (3:1) вместо почвы в течение 2÷3 недель. Для соблюдения естественного фотопериода использовались лампы (Philips Sun-T Agro 400 Na) в течение 16 часов в день при влажности 40 ÷ 60% в течение дня. Температура в течение периода освещения составляла +22 ÷ +24°C и +15°C – в течение ночного времени. Для

экспериментов использовали свежесрезанные проростки, помещенные в цилиндры с водой (растение без корневой системы), а также выкорчеванная корневая система. В каждом эксперименте использовалось 30÷150 г свежего растительного материала.

**Таблица 3.2**

**Состав питательной среды Линсмайер-Скуг**

<b>Компоненты</b>	<b>Концентрация (мг/л)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	438
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
MnSO <sub>4</sub>	15.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.25
KI	0.83
2,4-дихлорфенокси-уксусная кислота	0.22
Тиамин гидрохлорид (B <sub>1</sub> )	0.4
α-Нафталинуксусная кислота	0.19
мио-Инозитол	100
Трилон Б	41.3
Сахароза	30000

**Биосинтетический эксперимент (общая процедура).** Проведение биосинтетического эксперимента заключалось в прибавлении раствора меченных brassinosteroidов в питательную среду растительного материала. Количество добавляемых стероидов составляло от 0.4 мкг до 10 мкг. Brassinosteroidы добавляли в виде раствора в 75%-ом этаноле. Объем раствора составлял 10 мкл. После добавления растительный материал инкубировали при условиях, аналогичных использованным для его выращивания. Время инкубации составляло от 36 ч до 72 ч в различных экспериментах. По истечении времени инкубации из растительного материала с питательной средой выделяли фракцию метаболитов, как описано ниже. Параллельно с каждым биосинтетическим экспериментом проводили контрольный эксперимент, т.е. – эксперимент без добавления

брасиностероидов. В случае проведения количественного анализа эндогенных брасиностероидов меченный стандарт добавляли в растительный материал, и использовали последний без инкубационного периода.

Таблица 3.3

***R<sub>f</sub>* брасиностероидов**

Соединение	R <sub>f</sub>
3-Эпибрасинолид	0.25
Брасинолид	0.31
3-Эпикастастерон	0.31
2-Эпикастастерон	0.31 < R <sub>f</sub> < 0.41
Кастастерон	0.41
Секастерон	0.66
2,3-Диэписекастерон	0.69
Секастерол	0.71

**Выделение фракции, содержащей брасиностероиды из растительного материала (общая процедура).** Важный момент при проведении данного этапа – температура в бане роторного вакуум-испарителя **не должна превышать +40°C**. Питательную среду отделяли фильтрованием и экстрагировали равным объемом этилацетата. Отфильтрованный растительный материал трижды экстрагировали метанолом с использованием роторного гомогенизатора в течение 5 мин. Объединенные экстракты упаривали досуха и растворяли в растворе K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.5M). Полученный раствор трижды экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические экстракты упаривали досуха и растворяли в гексане. Полученный гексановый раствор трижды экстрагировали 80% метанолом. Объединенный метанольный экстракт, упаренный досуха, количественно переносили в пробирку для центрифугирования с метанолом (10 мл), которую затем помещали в ультразвуковую баню. Через 15 мин пробирку извлекали и центрифугировали (при 15°C, 4000 оборотов в минуту) в течение 15 мин. Отделенный метанольный фугат упаривали, количественно наносили на пластину для ТСХ и элюировали смесью хлороформ-метанол (88:12). Основываясь на значениях R<sub>f</sub> для стандартов (Таблица 3.3) и возможном пути метаболизма, собирали зону, содержащую брасиностероиды (0.21÷0.45 для полярных и/или 0.62÷0.73 для неполярных стероидов). Собранный силикагель количественно перенесли на фильтр и элюировали смесью хлороформ-метанол (1:1, 20 мл), затем метанолом (20 мл). Собранный элюент концентрировали и использовали для ВЭЖХ разделения.

Для фракции полярных брасиностероидов использовали градиент **A** MeCN-0.01% трифторуксусная кислота в воде (0-30 мин, 30-100% MeCN; 30-60 мин 100% MeCN; при постоянной скорости потока 2 мл мин<sup>-1</sup>), для неполярных – градиент **B**

MeCN-0.01% трифторуксусная кислота в воде (0-30 мин, 80%; 30-31 мин, 80-100% MeCN, 31-60 мин 100% MeCN; при постоянной скорости потока 2 мл мин<sup>-1</sup>). В соответствии со временем удерживания стандартов брассиностероидов (Таблица 3.4) собирали фракции элюента, которые затем концентрировали и использовали для ГХ-МС или ВЭЖХ-МС анализа.

Таблица 3.4

**Время удерживания брассиностероидов**

Соединение	Градиент	R <sub>t</sub> , мин	Фракция, мин
3-Эпибрассинолид	A	19.1	17.5 – 24.5
Брассинолид	A	20.9	17.5 – 24.5
3-Эпикастастерон	A	21.3	17.5 – 24.5
2-Эпикастастерон	A	21.3 < R <sub>t</sub> < 23.0	17.5 – 24.5
Кастастерон	A	23.0	17.5 – 24.5
Секастерон	B	25.1	24.0 – 28.0
2,3-Диэписекастерон	B	26.2	24.0 – 28.0
Секастерол	B	44.8	43.0 – 47.0

Таблица 3.5

**Условия ГХ-МС анализа**

Наименование параметра	Значение параметра
Объем пробы	1 мкл
Скорость газа носителя (гелий)	1 мл мин <sup>-1</sup>
Температура инжектора	280°C
Время задержки иглы	1 с
Деление потока	1/20
Начальная температура 1-й изотермы	170°C
Длительность изотермы 1-й изотермы	2 мин
Скорость программирования температуры	40°C мин <sup>-1</sup>
Начальная температура 2-й изотермы	280°C
Длительность 2-й изотермы	0 мин
Скорость программирования температуры	1.5°C мин <sup>-1</sup>
Начальная температура 3-й изотермы	320°C
Длительность 3-й изотермы	0 мин
Температура источника	280°C
Начало сканирования	6 мин
Конец сканирования	25 мин

**ГХ-МС анализ.** Для анализа фракцию растительного материала (менее 1 мг), содержащую brassinosteroids, обрабатывали раствором метилборной кислоты (10 мкл, 3 г/л) в смеси ацетонитрил-пиридин (19:1) при 62°C в течение 30 мин., или раствором триметилбороксина (10 мкл, 5 г/л) в смеси этилацетат-пиридин (19:1) при 62°C в течение 20 мин. Приготовленные растворы устойчивы в течение 3 дней. Аликвота полученного раствора анализировалась при постоянной скорости газа носителя в режиме программирования температуры (Таблица 3.5).

Качественный анализ базировался на одновременном мониторинге трех выбранных характеристичных ионов (SIM, selected ion monitoring) и времени удерживания соединений (Таблица 3.6). Количественный анализ базировался на отношении площадей пиков молекулярных ионов эндогенного бората и дейтерированного, с известной концентрацией (метод внутреннего стандарта). Описанный метод анализа характеризуется воспроизводимостью 98% и пределом детектирования  $3 \cdot 10^{-11}$  г (сигнал/шум = 3).

Таблица 3.6

**Параметры качественного ГХ-МС анализа производных brassinosteroids**

Исследуемое соединение	R <sub>T</sub> , мин	m/z, дальтон (I, %)
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]Секастерол	8.92	430 (30), 443 (100), 458 (60)
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]2,3-Диэписекастерон	11.20	158 (100), 245 (47), 474 (30)
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]Секастерон	11.48	158 (100), 245 (38), 474 (35)
[24,26- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]Кастастерон	12.22	161 (100), 287 (36), 518 (22)
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]3-Эпикастастерон	12.88	158 (100), 287 (14), 515 (12)
[24,26- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]Брассинолид	14.08	161 (100), 374 (21), 534 (3)
[26- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]3-Эпибрассинолид	17.28	158 (100), 374 (26), 531 (4)

**ВЭЖХ-МС анализ.** Для анализа фракцию растительного материала (менее 1 мг), содержащую brassinosteroids, обрабатывали раствором дансил-3-аминофенилборной кислоты (10 мкл, 5 г/л) в смеси ацетонитрил-пиридин (19:1) при 62°C в течение 30 мин. Аликвота полученного раствора анализировалась в изотермических условиях (Таблица 3.7) с градиентом MeCN-0.1% HCOOH в воде (0-10 мин: 75 % MeCN; 10-15 мин, 75-100 % MeCN; 15-25 мин 100 % MeCN; постоянная скорость потока 0.05 мл мин<sup>-1</sup>). Качественный анализ базировался на мониторинге [M+H]<sup>+</sup>, [M+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup>, кластерных изотопных ионов и времени удерживания соединений (Таблица 3.8). Количественный анализ базировался на отношении площадей пиков [M+H]<sup>+</sup> ионов 22,23-бората эндогенного стероида и дейтерированного стандарта (метод внутреннего стандарта). Описанный метод анализа характеризуется воспроизводимостью 96% и пределом детектирования  $5 \cdot 10^{-14}$  г (сигнал/шум = 5).

Таблица 3.7

## Условия ВЭЖХ-МС анализа

Наименование параметра	Значение параметра
Объем пробы	0.5 мкл
Температура термостата	30°C
Напряжение на конусе	15 В
Температура источника	80°C
Температура десольватации	280°C
Задержка на входящем канале	0.03 с
Смещение	0.00 дальтон
Время усреднения	0.22 с
Начало сканирования	0 мин
Конец сканирования	20 мин

Таблица 3.8

Параметры качественного ВЭЖХ-МС анализа производных  
брасиностероидов

Исследуемое соед.	R <sub>t</sub> , мин	[ <sup>2</sup> H <sub>0</sub> ][M+H] <sup>+</sup>	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ][M+H] <sup>+</sup>	[ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ][M+H] <sup>+</sup>
3-Эпибрасинолид	9.6	815	818	821
Брасинолид	11.2	815	818	821
3-Эпикастастерон	12.3	799	802	805
2-Эпикастастерон	13.5	799	802	805
Кастастерон	15.8	799	802	805
24-Эпикастастерон	16.4	799	—	—

**Исследования биосинтеза брасиностероидов в *Arabidopsis thaliana*.** В серии биосинтетических экспериментов использовали [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]кастастерон, [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]3-эпикастастерон, [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]брасинолид, [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]3-эпибрасинолид. Фракции растительного материала, содержащие метаболиты, выделяли и использовали для ГХ-МС или ВЭЖХ-МС анализа. В результате экспериментов были установлены биосинтетические превращения меченых стероидов (Таблица 2.1).

**Исследования биосинтеза брасиностероидов в *Lycopersicon esculentum*.** В серии биосинтетических экспериментов использовали [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]кастастерон, [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]брасинолид и [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]3-эпибрасинолид. Фракции растительного материала, содержащие метаболиты, выделяли и использовали для ВЭЖХ-МС анализа. В результате экспериментов были установлены биосинтетические превращения меченых стероидов (Таблица 2.2).

**Исследования биосинтеза brassinosterоидов в *Secale cereale*.** В результате сравнительного анализа эндогенного содержания 2,3-диэписекастерона и секастерона в сортах “Petka” и “Sorom” последний был выбран для проведения серии биосинтетических экспериментов. В качестве меченых стероидов использовали [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]тифастерин, [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]теастерон, [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]секастерол, [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]2,3-диэписекастерон, [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]секастерон, [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]кастастерон, [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]3-эпикастастерон, [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]2-эпикастастерон [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]брасинолид и [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]3-эпибрасинолид. Фракции растительного материала, содержащие метаболиты, выделяли и использовали для ГХ-МС или ВЭЖХ-МС анализа. В результате экспериментов были установлены биосинтетические превращения меченых стероидов (Таблица 2.4).

### **Выводы**

Исследование биотрансформаций, рассматриваемых в диссертационной работе, было неразрывно связано с использованием современных методов выделения и анализа метаболитов: различные виды хроматографического разделения, ВЭЖХ-МС, ГХ-МС. Использование передовых методов анализа позволяет идентифицировать метаболиты в ультранизкой концентрации и привело к обнаружению новых brassinosterоидов и альтернативного пути биосинтеза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Разработаны новые методы синтеза стероидных C<sup>22</sup>-альдегидов, которые могут быть использованы для получения ряда труднодоступных природных соединений и их аналогов, содержащих боковую цепь. Применение разработанных методов позволило осуществить синтез природных стероидов: кампестерина, криностерина, кастастерона, брассинолида [198, 199, 228-233, 294].
- Разработаны новые эффективные методы конвергентного синтеза дейтерированных брассиностероидов. Осуществлен синтез 15 соединений данного класса, использованных в качестве инструмента для изучения особенностей биосинтеза брассиностероидов в растениях [198, 238, 258, 294].
- Разработан новый эффективный метод выделения брассиностероидсодержащей фракции растительного материала и новый эффективный метод (ВЭЖХ-МС) анализа брассиностероидов, который на два порядка чувствительнее любого из известных ранее методов анализа [266, 288, 289].
- Впервые изучен биосинтез 3-эпибрассинолида и исследована обратимая конверсия между 3 $\alpha$ - и 3 $\beta$ -брассиностероидами в *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale* [199, 279].
- Обнаружены два новых брассиностероида 2,3-диэписекастерон и секастерол в *Secale cereale* [245, 288, 289].
- Открыт новый путь биосинтеза брассинолида, через эпоксибрассиностероиды в *Secale cereale* [245, 288, 289].



**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Ling W.H., Jones P.J.H. Dietary phytosterols - a review of metabolism, benefits and side-effects // *Life Sci.* - 1995. - Vol. 57, № 3. - P. 195-206.
2. Lu K.M., Lee M.H., Patel S.B. Dietary cholesterol absorption; more than just bile // *Trends Endocrinol. Metab.* - 2001. - Vol. 12, № 7. - P. 314-320.
3. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition / V.Piironen, D.G.Lindsay, T.A.Miettinen e. a. // *J. Sci. Food Agric.* - 2000. - Vol. 80, № 7. - P. 939-966.
4. Awad A.B., Fink C.S. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action // *J. Nutr.* - 2000. - Vol. 130, № 9. - P. 2127-2130.
5. Hartmann M.A. Plant sterols and the membrane environment // *Trends Plant Sci.* - 1998. - Vol. 3, № 5. - P. 170-175.
6. Svoboda J.A., Weirich G.F. Sterol-metabolism in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* - a review // *Lipids.* - 1995. - Vol. 30, № 3. - P. 263-267.
7. Dinan L., Harmatha J., Lafont R. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids // *J. Chromatogr. A.* - 2001. - Vol. 935, № 1-2. - P. 105-123.
8. Harrison D.M. The biosynthesis of triterpenoids and steroids // *Nat. Prod. Rep.* - 1985. - Vol. 2, № 6. - P. 525-560.
9. Harrison D.M. The biosynthesis of triterpenoids, steroids, and carotenoids // *Nat. Prod. Rep.* - 1988. - Vol. 5, № 4. - P. 387-415.
10. Harrison D.M. The biosynthesis of triterpenoids, steroids, and carotenoids // *Nat. Prod. Rep.* - 1990. - Vol. 7, № 6. - P. 459-484.
11. Brown G.D. The biosynthesis of steroids and triterpenoids // *Nat. Prod. Rep.* - 1998. - Vol. 15, № 6. - P. 653-696.
12. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement / D.Arighoni, S.Sagner, C.Latzel e. a. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1997. - Vol. 94, № 20. - P. 10600-10605.
13. Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae / J.Schwender, J.Zeidler, R.Groner e. a. // *FEBS Lett.* - 1997. - Vol. 414, № 1. - P. 129-134.
14. Lichtenthaler H.K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* - 1999. - Vol. 50. - P. 47-65.
15. Schwender J., Gemunden C., Lichtenthaler H.K. Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids // *Planta.* - 2001. - Vol. 212, № 3. - P. 416-423.
16. Lichtenthaler H.K. The plants' 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway for biosynthesis of isoprenoids // *Fett-Lipid.* - 1998. - Vol. 100, № 4-5. - P. 128-138.

17. Wanke M., Skorupinska-Tudek K., Swiezewska E. Isoprenoid biosynthesis *via* 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway // *Acta Biochim. Pol.* - 2001. - Vol. 48, № 3. - P. 663-672.
18. De-Eknamkul W., Potduang B. Biosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds *via* a mixed origin of isoprene units // *Phytochemistry.* - 2003. - Vol. 62, № 3. - P. 389-398.
19. Cloning, sequencing and analysis of the yeast *S. uvarum* ERG10 gene encoding acetoacetyl CoA thiolase / S.Dequin, R.Gloecker, C.J.Herbert, F.Boutelet // *Current Genetic.* - 1988. - Vol. 13. - P. 471-475.
20. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes / B.M.Lange, T.Rujan, W.Martin, R.Croteau // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2000. - Vol. 97, № 24. - P. 13172-13177.
21. Alex D., Bach T.J., Chye M.L. Expression of *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase is developmentally regulated and stress-responsive // *Plant J.* - 2000. - Vol. 22, № 5. - P. 415-426.
22. Hampton R., Denk D., Rine J. The biology of HMG-CoA reductase: The pros of contra-regulation // *Trends Biochem.Sci.* - 1996. - Vol. 21, № 4. - P. 140-145.
23. A soluble 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in the protozoan *Trypanosoma cruzi* / J.PenaDiaz, A.Montalvetti, A.Camacho e. a. // *Biochemical Journal.* - 1997. - Vol. 324. - P. 619-626.
24. Lange B.M., Ghassemian M. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism // *Plant Mol.Biol.* - 2003. - Vol. 51, № 6. - P. 925-948.
25. Cordier H., Karst F., Berges T. Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding mevalonate diphosphate decarboxylase // *Plant Mol.Biol.* - 1999. - Vol. 39, № 5. - P. 953-967.
26. Analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase gene family from *Arabidopsis thaliana* / M.Campbell, F.M.Hahn, C.D.Poulter, T.Leustek // *Plant Mol.Biol.* - 1997. - Vol. 36. - P. 323-328.
27. Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis / M.Rohmer, M.Seemann, S.Horbach e. a. // *J. Am. Chem. Soc.* - 1996. - Vol. 118, № 11. - P. 2564-2566.
28. *Arabidopsis* genes essential for seedling viability: isolation of insertional mutants and molecular cloning / G.J.Budziszewski, S.P.Lewis, L.W.Glover e. a. // *Genetics.* - 2001. - Vol. 159. - P. 1765-1778.
29. Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway / L.Carretero-Paulet,

- I.Ahumada, N.Cunillera e. a. // *Plant Physiol.* - 2002. - Vol. 129, № 8. - P. 1581-1591.
30. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds *via* a mevalonate-independent pathway / H.K.Lichtenthaler, J.Schwender, A.Disch, M.Rohmer // *FEBS Lett.* - 1997. - Vol. 400, № 3. - P. 271-274.
  31. Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana* / F.Rohdich, J.Wungsintaweekul, W.Eisenreich e. a. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2000. - Vol. 97. - P. 6451-6456.
  32. Studies on the nonmevalonate pathway: formation of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate from 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-erythritol / M.Takagi, T.Kuzuyama, K.Kaneda e. a. // *Tetrahedron Lett.* - 2000. - Vol. 41, № 18. - P. 3395-3398.
  33. Isoprenoid biosynthesis *via* the methylerythritol phosphate pathway. (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclodiphosphate by a cell-free system from *Escherichia coli* / M.Wolff, M.Seemann, C.Grosdemange-Billiard e. a. // *Tetrahedron Lett.* - 2002. - Vol. 43, № 14. - P. 2555-2559.
  34. Elucidation of novel biosynthetic pathways and metabolite flux patterns by retrobiosynthetic NMR analysis / A.Bacher, C.Rieder, D.Eichinger e. a. // *FEMS Microbiology Reviews.* - 1999. - Vol. 22. - P. 567-598.
  35. The isoprenoid pathway: cloning and characterization of fungal FPPS genes / V.Homann, K.Mende, C.Arntz e. a. // *Current Genetics.* - 1996. - Vol. 30, № 3. - P. 232-239.
  36. Schmitt D., Callan K., Gruissem W. Molecular and biochemical characterization of tomato farnesyl- protein transferase // *Plant Physiol.* - 1996. - Vol. 112, № 2. - P. 767-777.
  37. Delourme D., Lacroute F., Karst F. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for farnesyl diphosphate synthase by functional complementation in yeast // *Plant Mol.Biol.* - 1994. - Vol. 26. - P. 1867-1873.
  38. Minet M., Dufour M.E., Lacroute F. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs // *Plant J.* - 1992. - Vol. 2. - P. 417-422.
  39. *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes / N.Cunillera, M.Arro, D.Delourme e. a. // *J. Biol. Chem.* - 1996. - Vol. 271. - P. 7774-7780.
  40. Olszewski N., Sun T., Gubler F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways // *Plant Cell.* - 2002. - Vol. 14, Suppl. - P. S61-S80.
  41. Jarstfer M.B., Zhang D.L., Poulter C.D. Recombinant squalene synthase. Synthesis of non-head-to-tail isoprenoids in the absence of NADPH // *J. Am. Chem. Soc.* - 2002. - Vol. 124, № 30. - P. 8834-8845.

42. Stermer B.A., Bianchini G.M., Korth K.L. Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants // *J. Lipid Res.* - 1994. - Vol. 35. - P. 1133-1140.
43. Tansey T.R., Shechter I. Structure and regulation of mammalian squalene synthase // *BBA-Mol. Cell. Biol. Lipids.* - 2000. - Vol. 1529, № 1-3. - P. 49-62.
44. Mercer E.I. Inhibitors of sterol biosynthesis and their applications // *Prog. Lipid Res.* - 1993. - Vol. 32, № 4. - P. 357-416.
45. Radisky E.S., Poulter C.D. Squalene synthase: steady-state, pre-steady-state, and isotope-trapping studies // *Biochemistry.* - 2000. - Vol. 39, № 7. - P. 1748-1760.
46. Cloning, expression, and characterization of cDNAs encoding *Arabidopsis thaliana* squalene synthase / T.Nakashima, T.Inoue, A.Oka e. a. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1995. - Vol. 92, № 6. - P. 2328-2332.
47. Abe I., Rohmer M., Prestwich G.D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes // *Chem. Rev.* - 1993. - Vol. 93, № 6. - P. 2189-2206.
48. Xu R., Fazio G.C., Matsuda S.P.T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity // *Phytochemistry.* - 2001. - Vol. 65, № 2. - P. 261-291.
49. Husselstein-Muller T., Schaller H., Benveniste P. Molecular cloning and expression in yeast of 2,3-oxidosqualene- triterpenoid cyclases from *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol.Biol.* - 2001. - Vol. 45, № 1. - P. 75-92.
50. Jenson C., Jorgensen W.L. Computational investigations of carbenium ion reactions relevant to sterol biosynthesis // *J. Am. Chem. Soc.* - 1997. - Vol. 119. - P. 10846-10854.
51. Herrera J.B.R., Wilson W.K., Matsuda S.P.T. A tyrosine-to-threonine mutation converts cycloartenol synthase to an oxidosqualene cyclase that forms lanosterol as its major product // *J. Am. Chem. Soc.* - 2000. - Vol. 122, № 28. - P. 6765-6766.
52. New insights regarding the cyclization pathway for sterol biosynthesis from (S)-2,3-oxidosqualene / E.J.Corey, S.C.Virgil, H.Cheng e. a. // *J. Am. Chem. Soc.* - 1995. - Vol. 117, № 47. - P. 11819-11820.
53. Wu T.K., Griffin J.H. Conversion of a plant oxidosqualene-cycloartenol synthase to an oxidosqualene-lanosterol cyclase by random mutagenesis // *Biochemistry.* - 2002. - Vol. 41, № 26. - P. 8238-8244.
54. Corey E.J., Matsuda S.P.T., Bartel B. Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1993. - Vol. 90, № 24. - P. 11628-11632.
55. Inhibition of higher plant 2,3-oxidosqualene cyclases by nitrogen-containing oxidosqualene analogues / M.Taton, M.Ceruti, L.Cattel, A.Rahier // *Phytochemistry.* - 1996. - Vol. 43, № 1. - P. 75-81.

56. Biosynthesis of cucurbitacins 1. The transformation of  $10\alpha$ -cucurbita-5,24-dien-3- $\beta$ -ol into cucurbitacin C by seedlings of *Cucumis sativus* / G.Balliano, O.Caputo, F.Viola e. a. // *Phytochemistry*. - 1983. - Vol. 22, № 4. - P. 909-913.
57. Biosynthesis of cucurbitacins 2. Cyclization of squalene-2,3-epoxide to  $10\alpha$ -cucurbita-5,24-dien-3- $\beta$ -ol by microsomes from *Cucurbita maxima* seedlings / G.Balliano, O.Caputo, F.Viola e. a. // *Phytochemistry*. - 1983. - Vol. 22, № 4. - P. 915-921.
58. Connolly J.D., Hill R.A. Triterpenoids // *Nat. Prod. Rep.* - 1999. - Vol. 16. - P. 221-240.
59. Connolly J.D., Hill R.A. Triterpenoids // *Nat. Prod. Rep.* - 2000. - Vol. 17. - P. 463-482.
60. Connolly J.D., Hill R.A. Triterpenoids // *Nat. Prod. Rep.* - 2001. - Vol. 18. - P. 131-147.
61. Connolly J.D., Hill R.A. Triterpenoids // *Nat. Prod. Rep.* - 2001. - Vol. 18. - P. 560-578.
62. Biosynthesis of triterpenoids in cultured-cells, and regenerated and wild plant organs of *Taraxacum officinale* / T.Akashi, T.Furuno, T.Takahashi, S.Ayabe // *Phytochemistry*. - 1994. - Vol. 36, № 2. - P. 303-308.
63. Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases / M.Shibuya, H.Zhang, A.Endo e. a. // *Eur. J. Biochem.* - 1999. - Vol. 266, № 1. - P. 302-307.
64. Chappell J. The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami // *Curr. Opin. Plant Biol.* - 2002. - Vol. 5, № 2. - P. 151-157.
65. Kannenberg E.L., Poralla K. Hopanoid biosynthesis and function in bacteria // *Naturwissenschaften*. - 1999. - Vol. 86, № 4. - P. 168-176.
66. Hasegawa S., Bennett R.D., Maier V.P. Biosynthesis of limonoids in citrus seedlings // *Phytochemistry*. - 1984. - Vol. 23, № 8. - P. 1601-1603.
67. Hasegawa S., Herman Z. Biosynthesis of limonoids - conversion of deacetylnomilate to nomilin in citrus limon // *Phytochemistry*. - 1986. - Vol. 25, № 11. - P. 2523-2524.
68. Biosynthesis of limonoids in citrus - sites and translocation / S.Hasegawa, Z.Herman, E.Orme, P.Ou // *Phytochemistry*. - 1986. - Vol. 25, № 12. - P. 2783-2785.
69. Molecular and crystal structure of azadirachtin-H / T.R.Govindachari, G.Gopalakrishnan, S.S.Rajan e. a. // *Acta Crystallogr. Sect. B-Struct. Sci.* - 1996. - Vol. 52. - P. 145-150.
70. Acid-catalyzed isomerization of fucosterol and  $\Delta^5$ -avenasterol / A.Kamal-Eldin, K.Maatta, J.Toivo e. a. // *Lipids*. - 1998. - Vol. 33, № 11. - P. 1073-1077.
71. Plant sterols in vegetables and fruits commonly consumed in Sweden / L.Normen, M.Johnsson, H.Andersson e. a. // *Eur J Nutr.* - 1999. - Vol. 38, № 2. - P. 84-89.

72. Nes W.D., Janssen G.G., Bergenstrahle A. Structural requirements for transformation of substrates by the (*S*)-adenosyl-L-methionine -  $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyl transferase // *J. Biol. Chem.* - 1991. - Vol. 266, № 23. - P. 15202-15212.
73. Grebenok R.J., Galbraith D.W., Della-Penna D. Characterization of *Zea mays* endosperm C-24 sterol methyltransferase: one of two types of sterol methyltransferase in higher plants // *Plant Mol.Biol.* - 1997. - Vol. 34, № 6. - P. 891-896.
74. Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants / A.C.Diener, H.X.Li, W.X.Zhou e. a. // *Plant Cell.* - 2000. - Vol. 12, № 6. - P. 853-870.
75. Nes W.D. Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition // *BBA-Mol. Cell. Biol. Lipids.* - 2000. - Vol. 1529, № 1-3. - P. 63-88.
76. Plant sterol-C24-methyl transferases: different profiles of tobacco transformed with SMT1 or SMT2 / A.Schaeffer, P.Bouvier-Nave, P.Benveniste, H.Schaller // *Lipids.* - 2000. - Vol. 35, № 3. - P. 263-269.
77. Sterol C-24 methyltransferase type 1 controls the flux of carbon into sterol biosynthesis in tobacco seed / N.Holmberg, M.Harker, C.L.Gibbard e. a. // *Plant Physiol.* - 2002. - Vol. 130, № 1. - P. 303-311.
78. The *Pneumocystis carinii* drug target S-adenosyl-L-methionine: sterol C-24 methyl transferase has a unique substrate preference / E.S.Kaneshiro, J.A.Rosenfeld, M.Basselin-Eiweida e. a. // *Mol. Microbiol.* - 2002. - Vol. 44, № 4. - P. 989-999.
79. The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by sterol methyltransferase 2:1 / A.Schaeffer, R.Bronner, P.Benveniste, H.Schaller // *Plant J.* - 2001. - Vol. 25, № 6. - P. 605-615.
80. Rondet S., Taton M., Rahier A. Identification, characterization, and partial purification of 4 $\alpha$ -carboxysterol-C<sub>3</sub>-dehydrogenase/C<sub>4</sub>-decarboxylase from *Zea mays* // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1999. - Vol. 366, № 2. - P. 249-260.
81. Protein-protein interactions among C-4 demethylation enzymes involved in yeast sterol biosynthesis / C.Mo, M.Valachovic, S.K.Randall e. a. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2002. - Vol. 99, № 15. - P. 9739-9744.
82. Nes W.D., Venkatramesh M. Enzymology of phytosterol transformations // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* - 1999. - Vol. 34, № 2. - P. 81-93.
83. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG27 gene encoding the 3-keto reductase involved in C-4 sterol demethylation / D.Gachotte, S.E.Sen, J.Eckstein e. a. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1999. - Vol. 96, № 22. - P. 12655-12660.
84. Effect of tridemorph and fenpropimorph on sterol composition in fenugreek / C.Cerdon, A.Rahier, M.Taton, Y.Sauvaire // *Phytochemistry.* - 1996. - Vol. 41, № 2. - P. 423-431.

85. Functional cloning of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding cycloeucaleanol cycloisomerase / M.A.Lovato, E.A.Hart, M.J.R.Segura e. a. // J. Biol. Chem. - 2000. - Vol. 275, № 18. - P. 13394-13397.
86. Functional expression of *Saccharomyces cerevisiae* CYP51A1 encoding lanosterol-14-demethylase in tobacco results in bypass of endogenous sterol biosynthetic-pathway and resistance to an obtusifoliol-14-demethylase herbicide inhibitor / B.Grausem, N.Chaubet, C.Gigot e. a. // Plant J. - 1995. - Vol. 7, № 5. - P. 761-770.
87. Isolation and reconstitution of the heme-thiolate protein obtusifoliol 14 $\alpha$ -demethylase from *Sorghum bicolor* (L.) Moench / R.A.Kahn, S.Bak, C.E.Olsen e. a. // J. Biol. Chem. - 1996. - Vol. 271, № 51. - P. 32944-32950.
88. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the obtusifoliol 14 $\alpha$ -demethylase of *Sorghum bicolor* (L) Moench, a cytochrome P<sub>450</sub> orthologous to the sterol 14 $\alpha$ -demethylases (CYP51) from fungi and mammals / S.Bak, R.A.Kahn, C.E.Olsen, B.A. Halkier // Plant J. - 1997. - Vol. 11, № 2. - P. 191-201.
89. Characterization and catalytic properties of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase from *Mycobacterium tuberculosis* / A.Bellamine, A.T.Mangla, W.D.Nes, M.R. Waterman // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 1999. - Vol. 96, № 16. - P. 8937-8942.
90. Optimized expression and catalytic properties of a wheat obtusifoliol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) expressed in yeast. Complementation of *erg11* $\Delta$  yeast mutants by plant CYP51 / F.Cabello-Hurtado, M.Taton, N.Forthoffer e. a. // Eur. J. Biochem. - 1999. - Vol. 262, № 2. - P. 435-446.
91. Butters J.A., Zhou M.C., Hollomon D.W. The mechanism of resistance to sterol 14 $\alpha$  demethylation inhibitors in a mutant (Erg 40) of *Ustilago maydis* // Pest Manag. Sci. - 2000. - Vol. 56, № 3. - P. 257-263.
92. Cloning and expression of sterol  $\Delta^{14}$ -reductase from bovine liver / R.Roberti, A.M.Bennati, G.Galli e. a. // Eur. J. Biochem. - 2002. - Vol. 269, № 1. - P. 283-290.
93. Rozman D., Cotman M., Frangez R. Lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase and MAS sterols in mammalian gametogenesis // Mol. Cell. Endocrinol. - 2002. - Vol. 187, № 1-2. - P. 179-187.
94. FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis / K.Schrick, U.Mayer, A.Horrichs e. a. // Genes Dev. - 2000. - Vol. 14, № 12. - P. 1471-1484.
95. Interactions between sterol biosynthesis genes in embryonic development of *Arabidopsis* / K.Schrick, U.Mayer, G.Martin e. a. // Plant J. - 2002. - Vol. 31, № 1. - P. 61-73.

96. Purification, characterization and catalytic properties of human sterol 8-isomerase / W.D.Nes, W.X.Zhou, A.L.Dennis e. a. // *Biochem. J.* - 2002. - Vol. 367. - P. 587-599.
97. Isolation of the ERG2 gene, encoding  $\Delta^8$ - $\Delta^7$  sterol isomerase, from the maize smut pathogen *Ustilago maydis* / A.M.Bailey, R.S.Burden, C.S.James e. a. // *Experimental Mycology.* - 1994. - Vol. 18, № 1. - P. 87-92.
98. Isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* C-8,7 sterol isomerase: functional and structural similarities to mammalian C-8,7 sterol isomerase emopamil-binding protein / R.J.Grebenok, T.E.Ohnmeiss, A.Yamamoto e. a. // *Plant Mol.Biol.* - 1998. - Vol. 38, № 5. - P. 807-815.
99. Identification of cDNAs encoding sterol methyl-transferases involved in the second methylation step of plant sterol biosynthesis / P.Bouvier-Nave, T.Husselstein, T.Desprez, P.Benveniste // *Eur. J. Biochem.* - 1997. - Vol. 246, № 2. - P. 518-529.
100. Bouvier-Nave P., Husselstein T., Benveniste P. Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and the second methylation steps of plant sterol biosynthesis // *Eur. J. Biochem.* - 1998. - Vol. 256, № 1. - P. 88-96.
101. Sitbon F., Jonsson L. Sterol composition and growth of transgenic tobacco plants expressing type-1 and type-2 sterol methyltransferases // *Planta.* - 2001. - Vol. 212, № 4. - P. 568-572.
102. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models / M.D.Garcia, M.T.Saenz, M.A.Gomez, M.A.Fernandez // *Phytother. Res.* - 1999. - Vol. 13, № 1. - P. 78-80.
103.  $\Delta^7$ -Sterol-C<sub>5</sub>-desaturase: molecular characterization and functional expression of wild-type and mutant alleles / T.Husselstein, H.Schaller, D.Gachotte, P.Benveniste // *Plant Mol.Biol.* - 1999. - Vol. 39, № 5. - P. 891-906.
104. Stereochemistry of the reduction of 24-ethyl-desmosterol to sitosterol in tissue cultures of *Oryza sativa* / Y.Fujimoto, N.Sato, T.Okuzumi e. a. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 1998. - Vol. 8, № 3. - P. 205-208.
105. Guo D.A., Jia Z.H., Nes W.D. Stereochemistry of hydrogen migration from C-24 to C-25 during phytosterol biomethylation // *J. Am. Chem. Soc.* - 1996. - Vol. 118, № 35. - P. 8507-8508.
106. Mutations in the 3  $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta^{24}$ -reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis / H.R.Waterham, J.Koster, G.J.Romeijn e. a. // *Am. J. Hum. Genet.* - 2001. - Vol. 69, № 4. - P. 685-694.
107. Guo D.A., Venkatramesh M., Nes W.D. Developmental regulation of sterol biosynthesis in *Zea mays* // *Lipids.* - 1995. - Vol. 30, № 3. - P. 203-219.



108. Fujimoto Y., Morisaki M., Ikekawa N. Studies on the biosynthesis of sterol side chain in higher plants // *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn.* - 2000. - Vol. 120, № 10. - P. 863-873.
109. Purification and reconstitution of activity of *Saccharomyces cerevisiae* P<sub>450</sub>, a sterol  $\Delta^{22}$ -desaturase / S.L.Kelly, D.C.Lamb, A.J.Corran e. a. // *FEBS Lett.* - 1995. - Vol. 377, № 2. - P. 217-220.
110. Purification, reconstitution, and inhibition of cytochrome P-450 sterol  $\Delta^{22}$ -desaturase from the pathogenic fungus *Candida glabrata* / D.C.Lamb, S.Maspahy, D.E.Kelly e. a. // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 1999. - Vol. 43, № 7. - P. 1725-1728.
111. Adler J.H., Grebenok R.J. Occurrence, biosynthesis, and putative role of ecdysteroids in plants // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* - 1999. - Vol. 34, № 4. - P. 253-264.
112. Baltaev U.A. Phytoecdysteroids: structure, sources, and biosynthesis in plants // *Bioorg. Khim.* - 2000. - Vol. 26, № 12. - P. 892-925.
113. Dinan L., Savchenko T., Whiting P. On the distribution of phytoecdysteroids in plants // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2001. - Vol. 58, № 8. - P. 1121-1132.
114. Dinan L. Phytoecdysteroids: biological aspects // *Phytochemistry.* - 2001. - Vol. 57, № 3. - P. 325-339.
115. Adler J.H., Grebenok R.J. Biosynthesis and distribution of insect-molting hormones in plants - a review // *Lipids.* - 1995. - Vol. 30, № 3. - P. 257-262.
116. Devarenne T.P., Senmichael B., Adler J.H. Biosynthesis of ecdysteroids in *Zea mays* // *Phytochemistry.* - 1995. - Vol. 40, № 4. - P. 1125-1131.
117. In-vitro incorporation of radiolabeled cholesterol and mevalonic acid into ecdysteroid by hairy root cultures of a plant, *Serratula tinctoria* / J.P.Delbecque, P.Beydon, L.Chapuis, M.F.Coriocostet // *Eur. J. of Entomol.* - 1995. - Vol. 92, № 1. - P. 301-307.
118. Grieneisen M.L. Recent advances in our knowledge of ecdysteroid biosynthesis in insects and crustaceans // *Insect Biochem. Mol. Biol.* - 1994. - Vol. 24, № 2. - P. 115-132.
119. Biosynthesis of sterols and ecdysteroids in *Ajuga* hairy roots / Y.Fujimoto, K.Ohyama, K.Nomura e. a. // *Lipids.* - 2000. - Vol. 35, № 3. - P. 279-288.
120. A putative route to ecdysteroids - metabolism of cholesterol *invitro* by mildly disrupted prothoracic glands of *Manduca sexta* / M.L.Grieneisen, J.T.Warren, S.Sakurai, L.I.Gilbert // *Insect Biochemistry.* - 1991. - Vol. 21, № 1. - P. 41-51.
121. Biosynthesis of 20-hydroxyecdysone in *Ajuga* hairy roots: Fate of 6 $\alpha$ - and 6 $\beta$ -hydrogens of lathosterol / K.Ohyama, T.Kushiro, K.Nakamura, Y.Fujimoto // *Bioorg. Med. Chem.* - 1999. - Vol. 7, № 12. - P. 2925-2930.

122. Hyodo R., Fujimoto Y. Biosynthesis of 20-hydroxyecdysone in *Ajuga* hairy roots: the possibility of 7-ene introduction at a late stage // *Phytochemistry*. - 2000. - Vol. 53, № 7. - P. 733-737.
123. 3 $\beta$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholest-7-en-6-one as an intermediate of 20-hydroxyecdysone biosynthesis in a hairy root culture of *Ajuga reptans* var *Atropurpurea* / M.Nagakari, T.Kushiro, T.Yagi e. a. // *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* - 1994. - № 15. - P. 1761-1762.
124. Nomura K., Fujimoto Y. Mechanism of C-2 hydroxylation during the biosynthesis of 20- hydroxyecdysone in *Ajuga* hairy roots // *Chem. Pharm. Bull.* - 2000. - Vol. 48, № 3. - P. 344-348.
125. Biosynthesis of ecdysteroids in in vitro prothalli cultures of *Polypodium vulgare* / N.Reixach, J.IrurreSantilari, J.Casas e. a. // *Phytochemistry*. - 1996. - Vol. 43, № 3. - P. 597-602.
126. Ecdysone 20-monooxygenase, a cytochrome P<sub>450</sub> enzyme from spinach, *Spinacia oleracea* / R.J.Grebenok, D.W.Galbraith, I.Benveniste, R.Feyereisen // *Phytochemistry*. - 1996. - Vol. 42, № 4. - P. 927-933.
127. Matsumoto T., Tanaka N. Production of phytoecdysteroids by hairy root cultures of *Ajuga reptans* var *Atropurpurea* // *Agric. Biol. Chem.* - 1991. - Vol. 55, № 4. - P. 1019-1025.
128. Insect-induced synthesis of phytoecdysteroids in spinach, *Spinacia oleracea* / E.A.Schmelz, R.J.Grebenok, D.W.Galbraith, W.S.Bowers // *J. Chem. Ecol.* - 1999. - Vol. 25, № 8. - P. 1739-1757.
129. Biotransformations of putative phytoecdysteroid biosynthetic precursors in tissue cultures of *Polypodium vulgare* / N.Reixach, R.Lafont, F.Camps, J.Casas // *Eur. J. Biochem.* - 1999. - Vol. 266, № 2. - P. 608-615.
130. Evidence for the involvement of 3-oxo- $\Delta^4$  intermediates in ecdysteroid biosynthesis / C.Blais, C.Dauphin-Villemant, N.Kovganko e. a. // *Biochem. J.* - 1996. - Vol. 320. - P. 413-419.
131. Rees H.H., Isaac R.E. Biosynthesis and metabolism of ecdysteroids and methods of isolation and identification of the free and conjugated compounds // *Meth. Enzymol.* - 1985. - Vol. 111. - P. 377-410.
132. Ecdysteroid hormones and metabolites of the stone crab, *Menippe mercenaria* / W.L.Wang, E.Spaziani, Z.H.Huang e. a. // *J. Exp. Zool.* - 2000. - Vol. 286, № 7. - P. 725-735.
133. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen / M.D.Grove, G.F.Spencer, W.K.Rohwedder e. a. // *Nature*. - 1979. - Vol. 281, № 5728. - P. 216-217.
134. Altmann T. Recent advances in brassinosteroid molecular genetics // *Curr. Opin. Plant Biol.* - 1998. - Vol. 1, № 5. - P. 378-383.

135. Yokota T. The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids // Trends Plant Sci. - 1997. - Vol. 2, № 4. - P. 137-143.
136. Sasse J.M. Recent progress in brassinosteroid research // Physiol. Plant. - 1997. - Vol. 100, № 3. - P. 696-701.
137. Sakurai A., Fujioka S. Studies on biosynthesis of brassinosteroids // Biosci. Biotechnol. Biochem. - 1997. - Vol. 61, № 5. - P. 757-762.
138. Fujioka S., Sakurai A. Brassinosteroids // Nat. Prod. Rep. - 1997. - Vol. 14, № 1. - P. 1-10.
139. Mussig C., Altmann T. Physiology and molecular mode of action of brassinosteroids // Plant Physiol. Biochem. - 1999. - Vol. 37, № 5. - P. 363-372.
140. Bishop G.J., Yokota T. Plants steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response // Plant Cell Physiol. - 2001. - Vol. 42, № 2. - P. 114-120.
141. Khripach V., Zhabinskii V., de Groot A. Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century // Ann. Bot. - 2000. - Vol. 86, № 3. - P. 441-447.
142. Sakurai A. Brassinosteroid biosynthesis // Plant Physiol. Biochem. - 1999. - Vol. 37, № 5. - P. 351-361.
143. Mussig C., Altmann T. Brassinosteroid signaling in plants // Trends Endocrinol. Metab. - 2001. - Vol. 12, № 9. - P. 398-402.
144. Brassinosteroids - a new class of phytohormones / S.S.R.Rao, B.V.Vardhini, E.Sujatha, S.Anuradha // Curr. Sci. - 2002. - Vol. 82, № 10. - P. 1239-1245.
145. Conservation of function between mammalian and plant steroid 5 $\alpha$ -reductases / J.M.Li, M.G.Biswas, A.Chao e. a. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 1997. - Vol. 94, № 8. - P. 3554-3559.
146. The *Arabidopsis* deetiolated-2 mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis / S.Fujioka, J.M.Li, Y.H.Choi e. a. // Plant Cell. - 1997. - Vol. 9, № 11. - P. 1951-1962.
147. *Arabidopsis* det2 is defective in the conversion of (24*R*)-24-methylcholest-4-en-3-one to (24*R*)-24-methyl-5 $\alpha$ -cholestan-3-one in brassinosteroid biosynthesis / T.Noguchi, S.Fujioka, S.Takatsuto e. a. // Plant Physiol. - 1999. - Vol. 120, № 3. - P. 833-839.
148. Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S. An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway // Plant Physiol. - 2002. - Vol. 130, № 2. - P. 930-939.
149. Accumulation of 6-deoxocathasterone and 6-deoxocasterone in *Arabidopsis*, pea and tomato is suggestive of common rate-limiting steps in brassinosteroid biosynthesis / T.Nomura, T.Sato, G.J.Bishop e. a. // Phytochemistry. - 2001. - Vol. 57, № 2. - P. 171-178.

150. The DWF4 gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P<sub>450</sub> that mediates multiple 22 $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis / S.W.Choe, B.P.Dilkes, S.Fujioka e. a. // *Plant Cell*. - 1998. - Vol. 10, № 2. - P. 231-243.
151. Metabolic inversion of the 3-hydroxy function of brassinosteroids / A.Kolbe, B.Schneider, A.Porzell, G.Adam // *Phytochemistry*. - 1998. - Vol. 48, № 3. - P. 467-470.
152. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis / G.J.Bishop, T.Nomura, T.Yokota e. a. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1999. - Vol. 96, № 4. - P. 1761-1766.
153. A brassinolide biosynthetic pathway via 6-deoxocastasterone / Y.H.Choi, S.Fujioka, A.Harada e. a. // *Phytochemistry*. - 1996. - Vol. 43, № 3. - P. 593-596.
154. Fujioka S., Sakurai A. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids // *Physiol. Plant*. - 1997. - Vol. 100, № 3. - P. 710-715.
155. Biosynthesis of brassinosteroids in cultured cells of *Catharanthus roseus* / S.Fujioka, T.Noguchi, T.Watanabe e. a. // *Phytochemistry*. - 2000. - Vol. 53, № 5. - P. 549-553.
156. Brassinosteroid-6-oxidases from *Arabidopsis* and tomato catalyze multiple C-6 oxidations in brassinosteroid biosynthesis / Y.Shimada, S.Fujioka, N.Miyauchi e. a. // *Plant Physiol*. - 2001. - Vol. 126, № 2. - P. 770-779.
157. Biosynthesis of brassinosteroids in *Catharanthus roseus* 2. Biosynthesis of brassinolide from castasterone in cultured- cells of *Catharanthus roseus* / H.Suzuki, S.Fujioka, S.Takatsuto e. a. // *J. Plant Growth Regul.* - 1993. - Vol. 12, № 2. - P. 101-106.
158. Biosynthesis of brassinolide from teasterone via typhasterol and castasterone in cultured-cells of *Catharanthus roseus* / H.Suzuki, S.Fujioka, S.Takatsuto e. a. // *J. Plant Growth Regul.* - 1994. - Vol. 13, № 1. - P. 21-26.
159. Brenac P., Sauvaire Y. Accumulation of sterols and steroidal sapogenins in developing fenugreek pods: possible biosynthesis *in situ* // *Phytochemistry*. - 1996. - Vol. 41, № 2. - P. 415-422.
160. Moreau R.A., Whitaker B.D., Hicks K.B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses // *Prog. Lipid Res.* - 2002. - Vol. 41, № 6. - P. 457-500.
161. Friedman M. Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet // *J. Agric. Food Chem.* - 2002. - Vol. 50, № 21. - P. 5751-5780.
162. Abutiloside A, a 26-acylamino-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -cholesta-22-one glycoside from *Solanum abutiloides* / R.H.Tian, E.Ohmura, M.Matsui, T.Noharas // *Phytochemistry*. - 1997. - Vol. 44, № 4. - P. 723-726.
163. Stages in the biosynthesis of the epoxy lactol side-chain of Nic-1, insect antifeedant steroid of *Nicandra physaloides* / W.Andrewsmith, H.K.Gill,

- R.W.Smith, D.A.Whiting // J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1. - 1991. - № 2. - P. 291-296.
164. Monteagudo E.S., Burton G., Gros E.G. Biosynthesis of withanolides in *Acnistus breviflorus* - incorporation of labeled 24-methylenecholesterol // Phytochemistry. - 1994. - Vol. 35, № 4. - P. 927-929.
165. Veleiro A.S., Burton G., Gros E.G. Biosynthesis of withanolides in *Acnistus breviflorus* - biogenetic relationships among the main withanolides // Phytochemistry. - 1985. - Vol. 24, № 11. - P. 2573-2575.
166. Veleiro A.S., Burton G., Gros E.G. Biosynthesis of withanolides in *Acnistus Breviflorus* // Phytochemistry. - 1985. - Vol. 24, № 10. - P. 2263-2265.
167. Gavidia I., Perez-Bermudez P., Seitz H.U. Cloning and expression of two novel aldo-keto reductases from *Digitalis purpurea* leaves // Eur. J. Biochem. - 2002. - Vol. 269, № 12. - P. 2842-2850.
168.  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase from *Digitalis lanata* Ehrh. - a multifunctional enzyme in steroid metabolism? / A.Finsterbusch, P.Lindemann, R.Grimm e. a. // Planta. - 1999. - Vol. 209, № 4. - P. 478-486.
169. Eisenbeiss M., Kreis W., Reinhard E. Cardenolide biosynthesis in light- and dark-grown *Digitalis lanata* shoot cultures // Plant Physiol. Biochem. - 1999. - Vol. 37, № 1. - P. 13-23.
170. Effects of various pregnanes and two 23-nor-5-cholenic acids on cardenolide accumulation in cell and organ cultures of *Digitalis lanata* / W.Haussmann, W.Kreis, U.Stuhlemmer, E.Reinhard // Planta Med. - 1997. - Vol. 63, № 5. - P. 446-453.
171. Stuhlemmer U., Kreis W. Cardenolide formation and activity of pregnane-modifying enzymes in cell suspension cultures, shoot cultures and leaves of *Digitalis lanata* // Plant Physiol. Biochem. - 1996. - Vol. 34, № 1. - P. 85-91.
172. Gavidia I., PerezBermudez P. Cardenolides of *Digitalis obscura*: the effect of phosphate and manganese on growth and productivity of shoot-tip cultures // Phytochemistry. - 1997. - Vol. 45, № 1. - P. 81-85.
173. Some quantitative aspects of cardenolide synthesis from malonate in *Asclepias curassavica* / H.W.Groeneveld, Y.E.M.Vanberkel, A.Binnekamp, D.Seykens // Phytochemistry. - 1994. - Vol. 37, № 6. - P. 1605-1610.
174. Lindemann P., Luckner M. Biosynthesis of pregnane derivatives in somatic embryos of *Digitalis lanata* // Phytochemistry. - 1997. - Vol. 46, № 3. - P. 507-513.
175. Groeneveld H.W., Binnekamp A., Seykens D. Cardenolide biosynthesis from acetate in *Asclepias curassavica* // Phytochemistry. - 1991. - Vol. 30, № 8. - P. 2577-2585.
176. Stuhlemmer U., Kreis W. Does the malonyl-coenzyme A: 21-hydroxypregnane 21-hydroxy- malonyltransferase catalyze the first step in the formation of the

- butenolide ring of cardenolides? // *Tetrahedron Lett.* - 1996. - Vol. 37, № 13. - P. 2221-2224.
177. Steyn P.S., van Heerden F.R. Bufadienolides of plant and animal origin // *Nat. Prod. Rep.* - 1998. - Vol. 15, № 4. - P. 397-413.
178. Krenn L., Kopp B. Bufadienolides from animal and plant sources // *Phytochemistry.* - 1998. - Vol. 48, № 1. - P. 1-29.
179. Vitamin D compounds in plants / R.Boland, M.Skliar, A.Curino, L.Milanesi // *Plant Sci.* - 2003. - Vol. 164. - P. 357-369.
180. Norman T.C., Normans A.W. Consideration of chemical mechanisms for the nonphotochemical production of vitamin D<sub>3</sub> in biological systems // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 1993. - Vol. 3, № 9. - P. 1785-1788.
181. Effect of culture conditions on the synthesis of vitamin D-3 metabolites in *Solanum glaucophyllum* grown in vitro / A.Curino, L.Milanesi, S.Benassati e. a. // *Phytochemistry.* - 2001. - Vol. 58, № 1. - P. 81-89.
182. Curino A., Skliar M., Boland R. Identification of 7-dehydrocholesterol, vitamin D<sub>3</sub>, 25(OH)-vitamin D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> in *Solanum glaucophyllum* cultures grown in absence of light // *Biochimica et Biophysica Acta.* - 1998. - Vol. 1425, № 3. - P. 485-492.
183. Adam G., Marquardt V. Brassinosteroids // *Phytochemistry.* - 1986. - Vol. 25, № 8. - P. 1787-1799.
184. Kim S.K. Natural occurrences of brassinosteroids // *ACS Symp. Ser.* - 1991. - Vol. 474. - P. 26-35.
185. Clouse S.D., Sasse J.M. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* - 1998. - Vol. 49. - P. 427-451.
186. Khripach V.A., Zhabinskii V.N., de Groot A.E., Brassinosteroids - A new class of plant hormones.- San Diego: Academic Press, 1998.- 456 p.
187. Piatak D.M., Wicha J. Various approaches to the construction of aliphatic side chains of steroids and related compounds // *Chem. Rev.* - 1978. - Vol. 78, № 3. - P. 199-241.
188. Aspects of synthesis and bioactivity of brassinosteroids / G.Adam, V.Marquardt, H.M.Vorbrodt e. a. // *ACS Symp. Ser.* - 1991. - Vol. 474. - P. 74-85.
189. Жабинский В.Н., Хрипач В.А., Ольховик В.К. Методы стереоселективного построения боковых цепей стероидов // *ЖОрХ.* - 1996.- Т. 32, № 3.- С. 327-363.
190. Spencer T.A., Li D., Russel J.S. Further studies on the synthesis of 24(S),25-epoxycholesterol. A new, efficient preparation of desmosterol // *J. Org. Chem.* - 2000. - Vol. 65, № 7. - P. 1919-1923.

191. Wiersig J.R., Waespe-Sarcevic N., Djerassi C. Stereospecific synthesis of the side chain of the steroidal plant sex hormone oogeniol // *J. Org. Chem.* - 1979. - Vol. 44, № 19. - P. 3374-3382.
192. Stereoselective synthesis of (22*R*,23*R*,24*S*)-3 $\beta$ -hydroxy-5-ene-22,23-dihydroxy-24-methyl-cholestane - a brassinolide intermediate from 16-dehydropregnenolone acetate / B.G.Hazra, P.L.Joshi, B.B.Bahule e. a. // *Tetrahedron.* - 1994. - Vol. 50, № 8. - P. 2523-2532.
193. Castedo L., Granja J.R., Mourino A. (2,3)-Wittig sigmatropic rearrangements in steroid synthesis. New stereocontrolled approach to steroidal side chains at C-20 // *Tetrahedron Lett.* - 1985. - Vol. 26, № 40. - P. 4959-4960.
194. Okada K., Mori K. Brassinolide and its analogs. 3. Synthesis of brassinolide analogs and their plant growth-promoting activity // *Agric. Biol. Chem.* - 1983. - Vol. 47, № 1. - P. 89-95.
195. 3-Dehydroteasterone, a 3,6-diketobrassinosteroid as a possible biosynthetic intermediate of brassinolide from wheat-grain / T.Yokota, M.Nakayama, T.Wakisaka e. a. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* - 1994. - Vol. 58, № 6. - P. 1183-1185.
196. New synthetic strategy for the synthesis of 24-epibrassinolide / C.Brosa, R.Puig, X.Comas, C.Fernandez // *Steroids.* - 1996. - Vol. 61, № 9. - P. 540-543.
197. Synthesis of 6-oxy functionalized campest-4-en-3-ones: efficient hydroperoxidation at C-6 of campest-5-en-3-one with molecular oxygen and silica gel / H.Seto, S.Fujioka, S.Takatsuto e. a. // *Steroids.* - 2000. - Vol. 65, № 8. - P. 443-449.
198. Синтез [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]- и [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-брасиностероидов / В.Н.Жабинский, В.А.Хрипач, О.В.Константинова, А.П.Антончик, Б.Шнайдер // *Химия, структура и функции биомолекул: Тез. докл. науч. конф.* - Минск. - Весці НАН Беларусі - 2004. - № 2 С. 51-52.
199. Occurrence and synthesis of labeled brassinosteroids / A.P.Antonchick, O.V.Konstantinova, V.N.Zhabinskii, V.A.Khripach, B.Schneider // *Young scientist symposium "Future trends in phytochemistry": Book of Abstracts.*-Gargano, 2002. - P. P1.
200. A convenient synthesis of (22*S*)-22-hydroxycampesterol and some related steroids / S.Takatsuto, T.Watanabe, C.Gotoh e. a. // *J. Chem. Res.-S.* - 1998. - № 4. - P. 176-177.
201. Synthesis of cathasterone and its related putative intermediates in brassinolide biosynthesis / S.Takatsuto, H.Kuriyama, T.Noguchi e. a. // *J. Chem. Res.-S.* - 1997. - № 11. - P. 418-419.
202. Sakakibara M., Mori K. Brassinolide and its analogs. 2. Facile synthesis of (22*R*,23*R*)-homobrassinolide // *Agric. Biol. Chem.* - 1982. - Vol. 46, № 11. - P. 2769-2779.

203. Brassinolide and its analogs 1. Synthesis of (22*S*, 23*S*)-homobrassinolide and brassinolide from stigmasterol / K.Mori, M.Sakakibara, Y.Ichikawa e. a. // *Tetrahedron*. - 1982. - Vol. 38, № 14. - P. 2099-2109.
204. Dietary plant sterols alter the serum plant sterol concentration but not the cholesterol precursor sterol concentrations in young children (The STRIP study) / A.Tammi, T.Ronnemaa, L.Valsta e. a. // *J. Nutr.* - 2001. - Vol. 131, № 7. - P. 1942-1945.
205. Plat J., Mensink R.P. Effects of plant sterols and stanols on lipid metabolism and cardiovascular risk // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* - 2001. - Vol. 11, № 1. - P. 31-40.
206. Plant sterol-enriched margarine lowers plasma LDL in hyperlipidemic subjects with low cholesterol intake: Effect of fibrate treatment / F.Nigon, C.Serfaty-Lacrosniere, I.Beucler e. a. // *Clin. Chem. Lab. Med.* - 2001. - Vol. 39, № 7. - P. 634-640.
207. Miettinen T.A. Phytosterols - what plant breeders should focus on // *J. Sci. Food Agric.* - 2001. - Vol. 81, № 9. - P. 895-903.
208. Comparison of the effects of plant sterol ester and plant stanol ester-enriched margarines in lowering serum cholesterol concentrations in hypercholesterolaemic subjects on a low-fat diet / M.A.Hallikainen, E.S.Sarkkinen, H.Gylling e. a. // *Eur. J. Clin. Nutr.* - 2000. - Vol. 54, № 9. - P. 715-725.
209. The *Arabidopsis* dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis / S.Choe, B.P.Dilkes, B.D.Gregory e. a. // *Plant Physiol.* - 1999. - Vol. 119, № 3. - P. 897-907.
210. Takatsuto S., Ikekawa N. Synthesis of [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]crinosterol, a synthetic intermediate of [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]brassinolide and [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]castasterone // *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1.* - 1986. - № 4. - P. 591-593.
211. Stereoselective synthesis of crinosterol [(22*E*,24*S*)-ergosta-22-dien-3β-ol] / M.Anastasia, P.Allevi, P.Ciuffreda, A.Fiecchi // *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1.* - 1983. - № 10. - P. 2365-2367.
212. Hirano Y., Djerassi C. Stereoselective synthesis *via* claisen rearrangements of the marine sterols ocellasterol, patinosterol, and 22,23-dihydroocelasterol // *J. Org. Chem.* - 1982. - Vol. 47, № 12. - P. 2420-2426.
213. Zielinski J., Li H., Djerassi C. Stereoselective synthesis of (22*R*)- and (22*S*)-22-methylcholesterol // *J. Org. Chem.* - 1982. - Vol. 47, № 4. - P. 620-625.
214. Rabinowitz M.H., Djerassi C. Biosynthetic-studies of marine lipids. 39. 19-norsterols - the course of C-19 methyl elimination // *J. Am. Chem. Soc.* - 1992. - Vol. 114, № 1. - P. 304-317.
215. Use of dihydroquinidine 9-O-(9'-phenanthryl) ether in osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation in the synthesis of brassinosteroids / C.Brosa,



- R.Peracaula, R.Puig, M.Ventura // *Tetrahedron Lett.* - 1992. - Vol. 33, № 46. - P. 7057-7060.
216. Studies on steroidal plant-growth regulators. 29. Osmium tetroxide-catalyzed asymmetric dihydroxylation of the (22*E*,24*R*)-24-alkyl and the (22*E*,24*S*)-24-alkyl steroidal unsaturated side-chain / L.F.Huang, W.S.Zhou, L.Q.Sun, X.F.Pan // *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1.* - 1993. - № 14. - P. 1683-1686.
217. A convenient stereoselective synthesis of castasterone and its analogues using arsenic ylides / F.Werner, G.Parmentier, B.Luu, L.Dinan // *Tetrahedron.* - 1996. - Vol. 52, № 15. - P. 5525-5532.
218. Improved synthesis of castasterone and brassinolide / T.Watanabe, S.Takatsuto, S.Fujioka, A.Sakurai // *J. Chem. Res.-S.* - 1997. - № 10. - P. 360-361.
219. Studies on steroidal plant-growth regulator 21. A stereoselective construction of brassinosteroid side-chain - a new practical synthesis of brassinolide and its analogs / W.S.Zhou, L.F.Huang, L.Q.Sun, X.F.Pan // *Tetrahedron Lett.* - 1991. - Vol. 32, № 46. - P. 6745-6748.
220. Synthesis of castasterone and its 22*S*,23*S*-isomer: 2 plant growth-promoting ketones / M.Anastasia, P.Ciuffreda, M.Delpuppo, A.Fiecchi // *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1.* - 1983. - № 2. - P. 383-386.
221. Back T.G., Krishna M.V. Synthesis of castasterone and formal synthesis of brassinolide from stigmasterol *via* a selenosulfonation approach // *J. Org. Chem.* - 1991. - Vol. 56, № 1. - P. 454-457.
222. Back T.G., Blazecka P.G., Krishna M.V. A new synthesis of castasterone and brassinolide from stigmasterol - a concise and stereoselective elaboration of the side-chain from a C-22 aldehyde // *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.* - 1993. - Vol. 71, № 2. - P. 156-163.
223. Preparation, conformational analysis, and biological evaluation of 6a-carbabrassinolide and related compounds / H.Seto, S.Hiranuma, S.Fujioka e. a. // *Tetrahedron.* - 2002. - Vol. 58, № 48. - P. 9741-9749.
224. Baba J., Yokota T., Takahashi N. Brassinolide-related new bioactive steroids from *Dolichos lablab* seed // *Agric. Biol. Chem.* - 1983. - Vol. 47, № 3. - P. 659-661.
225. H-1 and C-13 NMR analysis of brassinosteroids / A.Porzal, V.Marquardt, G.Adam e. a. // *Magn. Reson. Chem.* - 1992. - Vol. 30, № 7. - P. 651-657.
226. Epimerization at C-5 of brassinolide with sodium methoxide and the biological activity of 5-epi-brassinolide in the rice lamina inclination test / H.Seto, S.Fujioka, H.Koshino e. a. // *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1.* - 1998. - № 20. - P. 3355-3358.
227. Side chain conformation of the growth-promoting phytohormones brassinolide and 24-epibrassinolide / M.Stoldt, A.Porzal, G.Adam, W.Brandt // *Magn. Reson. Chem.* - 1997. - Vol. 35, № 9. - P. 629-636.
228. [3,3]-Claisen rearrangements in 24 $\alpha$ -methyl steroid synthesis. Application to campesterol, crinosterol, and  $\Delta^{25}$ -crinosterol side chain construction /

- V.A.Khripach, V.N.Zhabinskii, O.V.Konstantinova, N.B.Khripach, A.P.Antonchick, B.Schneider // *Steroids*. - 2002. - Vol. 67, № 7. - P. 597-603.
229. Synthesis of [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]brassinosteroids / V.A.Khripach, V.N.Zhabinskii, O.V.Konstantinova, A.P.Antonchick, B.Schneider // *Steroids*. - 2002. - Vol. 67, № 7. - P. 587-595.
230. Синтез кампестерина / А.В.Антончик, В.А.Хрипач, В.Н.Жабинский, О.В.Константинова, А.П.Антончик, Н.Б.Хрипач // *Органическая химия - упадок или возрождение?: Тез. докл. науч. конф.* - Москва - Углич, 2003. - С. 5.
231. Перегруппировка Кляйзена в синтезе 24 $\alpha$ -метил стероидов / О.В.Константинова, А.П.Антончик, В.Н.Жабинский, В.А.Хрипач // *Актуальные проблемы органической химии: Тез. докл. науч. конф.* - Новосибирск, 2001. - С. 20.
232. Comparative study on campesterol synthesis / O.V.Konstantinova, V.A.Khripach, V.N.Zhabinskii, A.V.Antonchick, A.P.Antonchick, N.B.Khripach // *20th Conf. on Isoprenoids: Book of Abstracts*. - Liberec. - Chem Listy. - 2003. - Vol. 97 - P. s301-302.
233. Synthesis of [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]brassinosteroids / O.V.Konstantinova, V.A.Khripach, V.N.Zhabinskii, A.P.Antonchick, B.Schneider // *International Isotope Society, 9th conference: Book of Abstracts*. - Bad Soden. - J. Labelled Cpd. Radiopharm. 2001. - Vol. 44 - P. 958.
234. Marek I., Normant J.F. Synthesis and reactivity of sp(3)-geminated organodimetallics // *Chem. Rev.* - 1996. - Vol. 96, № 8. - P. 3241-3268.
235. Gais H.J., Vollhardt J. Ortho lithiation of lithium salts of alkyl phenyl sulfones: A <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H NMR investigation // *Tetrahedron Lett.* - 1988. - Vol. 29, № 13. - P. 1529-1532.
236. Unexpected differences in the  $\alpha$ -halogenation and related reactivity of sulfones with perhaloalkanes in KOH-t-BuOH / C.Y.Meyers, R.Chan-Yu-King, D.H.Hua e. a. // *J. Org. Chem.* - 2003. - Vol. 68, № 2. - P. 500-511.
237. Fujioka S., Yokota T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids // *Annu. Rev. Plant Biol.* - 2003. - Vol. 54. - P. 137-164.
238. Synthesis of hexadeuterated 23-dehydroxybrassinosteroids / V.A.Khripach, V.N.Zhabinskii, A.P.Antonchick, O.V.Konstantinova, B.Schneider // *Steroids*. - 2002. - Vol. 67, № 13-14. - P. 1101-1108.
239. Siddall J.B., Cross A.D., Fried J.H. Steroids. CCXCII. Synthetic studies on insect hormones. II. The synthesis of ecdysone // *J. Am. Chem. Soc.* - 1966. - Vol. 88, № 4. - P. 862-863.
240. Identification of a new brassinosteroid, cathasterone, in cultured-cells of *Catharanthus roseus* as a biosynthetic precursor of teasterone / S.Fujioka,

- T.Inoue, S.Takatsuto e. a. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* - 1995. - Vol. 59, № 8. - P. 1543-1547.
241. Triterpenes and sterols from *Ruscus aculeatus* / C.Dunouau, R.Belle, A.Oulad-Ali e. a. // *Planta Med.* - 1996. - Vol. 62, № 2. - P. 189-190.
242. Takatsuto S., Ikekawa N. Synthesis of deuterio-labeled brassinosteroids, [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]brassinolide, [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]castasterone, [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]typhasterol, and [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]teasterone // *Chem. Pharm. Bull.* - 1986. - Vol. 34, № 10. - P. 4045-4049.
243. Aburatani M., Takeuchi T., Mori K. Synthesis of brassinolide. 4. Facile syntheses of brassinosteroids - brassinolide, castasterone, teasterone and typhasterol // *Agric. Biol. Chem.* - 1987. - Vol. 51, № 7. - P. 1909-1913.
244. Takatsuto S. Synthesis of teasterone and typhasterol, brassinolide-related steroids with plant-growth-promoting activity // *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1.* - 1986. - № 10. - P. 1833-1836.
245. Biosynthesis of 2,3-epoxybrassinosteroids in seedlings of *Secale cereale* / A.P.Antonchick, B.Schneider, V.N.Zhabinskii, O.V.Konstantinova, V.A.Khripach // *Phytochemistry.* - 2003. - Vol. 63, № 7. - P. 771-776.
246. Stereoselective synthesis of plant growth-promoting steroids, brassinolide, castasterone, typhasterol, and their 28-nor analogs / S.Takatsuto, N.Yazawa, M.Ishiguro e. a. // *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1.* - 1984. - № 2. - P. 139-146.
247. Synthesis of secasterone and further epimeric 2,3-epoxybrassinosteroids / B.Voigt, S.Takatsuto, T.Yokota, G.Adam // *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1.* - 1995. - № 12. - P. 1495-1498.
248. Takatsuto S., Ikekawa N. Synthesis of [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]brassinolide, [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]castasterone, [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]typhasterol, and [26,28-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]testosterone // *Chem. Pharm. Bull.* - 1986. - Vol. 34, № 3. - P. 1415-1418.
249. Levinson E.E., Traven V.F. Synthesis of 3,24-diepicasterone: A natural brassinosteroid with a trans-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol function // *J. Chem. Res.-S.* - 1996. - № 4. - P. 196-197.
250. 3-Oxoteasterone and the epimerization of teasterone - identification in *Lily anthers* and *Distylium racemosum* leaves and its biotransformation into typhasterol / H.Abe, C.Honjo, Y.Kyokawa e. a. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* - 1994. - Vol. 58, № 5. - P. 986-989.
251. An alternative brassinolide biosynthetic pathway *via* late C-6 oxidation / Y.H.Choi, S.Fujioka, T.Nomura e. a. // *Phytochemistry.* - 1997. - Vol. 44, № 4. - P. 609-613.
252. Brassinosteroids in *Arabidopsis thaliana* / S.Fujioka, T.Noguchi, T.Yokota e. a. // *Phytochemistry.* - 1998. - Vol. 48, № 4. - P. 595-599.
253. Activity of brassinosteroids in the dwarf rice lamina inclination bioassay / S.Fujioka, T.Noguchi, S.Takatsuto, S.Yoshida // *Phytochemistry.* - 1998. - Vol. 49, № 7. - P. 1841-1848.

254. Synthesis of new naturally occurring 6-deoxo brassinosteroids / S.Takatsuto, T.Watanabe, S.Fujioka, A.Sakurai // J. Chem. Res.-S. - 1997. - № 4. - P. 134-135.
255. Synthesis of new naturally occurring 6-deoxo brassinosteroids / S.Takatsuto, T.Watanabe, S.Fujioka, A.Sakurai // Journal of Chemical Research-M. - 1997. - . - P. 901-924.
256. Synthesis of 2,24-diepicasterone and its 22*S*,23*S*-isomer - novel brassinosteroids with a trans-2,3-diol function / E.E.Levinson, N.A.Kuznetsova, N.Y.Podkhalyuzina, V.F.Traven // Mendeleev Commun. - 1994. - № 3. - P. 96-97.
257. Synthesis of 2,24-diepicasterone and 3,24-diepicasterone as potential brassinosteroid metabolites of the cockroach *Periplaneta americana* / B.Voigt, A.Porzel, G.Adam e. a. // Collect. Czech. Chem. Commun. - 2002. - Vol. 67, № 1. - P. 91-102.
258. Synthesis of [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]22 $\alpha$ ,23 $\alpha$ -dihydroxy- and [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22 $\alpha$ -hydroxy brassinosteroids / V.A.Khripach, V.N.Zhabinskii, O.V.Konstantinova, N.B.Khripach, A.P.Antonchick, B.Schneider // 19th Conf. on Isoprenoids: Book of Abstracts. - Gdansk-Jurata, 2001. - P. 97.
259. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development / A.Kauschmann, A.Jessop, C.Koncz e. a. // Plant J. - 1996. - Vol. 9, № 5. - P. 701-713.
260. Altmann T. A tale of dwarfs and drugs: brassinosteroids to the rescue // Trends in Genetics. - 1998. - Vol. 14, № 12. - P. 490-495.
261. Bishop G.J. Brassinosteroid mutants of crops // J. Plant Growth Regul. - 2003. - Vol. 22, № 4. - P. 325-335.
262. Croizier A., Moritz T. Physico-chemical methods of plant hormone analysis // Ed. Bernardi G. New comprehensive biochemistry. Biochemistry and molecular biology of plant hormones. - Evsevier, 1999. - P. 23-60.
263. Gamoh K., Takatsuto S. Liquid-chromatographic assay of brassinosteroids in plants // J. Chromatogr. A. - 1994. - Vol. 658, № 1. - P. 17-25.
264. Motegi C., Takatsuto S., Gamoh K. Identification of brassinolide and castasterone in the pollen of orange (*Citrus sinensis* osbeck) by high-performance liquid-chromatography // J. Chromatogr. A. - 1994. - Vol. 658, № 1. - P. 27-30.
265. Takatsuto S. Brassinosteroids - distribution in plants, bioassays and microanalysis by gas-chromatography mass-spectrometry // J. Chromatogr. A. - 1994. - Vol. 658, № 1. - P. 3-15.
266. Svatos A., Antonchick A., Schneider B. Determination of brassinosteroids in the sub-femtomolar range using dansyl-3-aminophenylboronate derivatization and electrospray mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. - 2004. - Vol. 18, № 7. - P. 818-823.
267. Possible involvement of 3-dehydroteasterone in the conversion of teasterone to typhasterol in cultured-cells of *Catharanthus roseus* / H.Suzuki, T.Inoue,

- S.Fujioka e. a. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* - 1994. - Vol. 58, № 6. - P. 1186-1188.
268. Castasterone and brassinolide in *Raphanus Sativus* seeds / J.Schmidt, T.Yokota, G.Adam, N.Takahashi // *Phytochemistry.* - 1991. - Vol. 30, № 1. - P. 364-365.
269. Sakurai A., Fujioka S., Saimoto H. Production of brassinosteroids in plant-cell cultures // *ACS Symp. Ser.* - 1991. - Vol. 474. - P. 97-106.
270. 28-Homotyphasterol, a new natural brassinosteroid from rice (*Oryza sativa* L) bran / H.Abe, S.Takatsuto, M.Nakayama, T.Yokota // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* - 1995. - Vol. 59, № 2. - P. 176-178.
271. 6-Deoxotyphasterol and 3-dehydro-6-deoxoteasterone, possible precursors to brassinosteroids in the pollen of *Cupressus arizonica* / P.G.Griffiths, J.M.Sasse, T.Yokota, D.W.Cameron // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* - 1995. - Vol. 59, № 5. - P. 956-959.
272. Comparative analytical quantitation of clenbuterol in biological matrices using GC-MS and EIA / I.K.Abukhalaf, Deutsch D.A., B.A.Parks e. a. // *Biomed Chromatogr.* - 2000. - Vol. 14, № 2. - P. 99-105.
273. Gas chromatographic/electron impact mass spectrometric selective confirmatory analysis of clenbuterol in human and bovine urine / A.Polettini, A.Groppi, M.C.Ricossa, M.Montagna // *Biol Mass Spectrom.* - 1993. - Vol. 22, № 8. - P. 457-461.
274. High-performance liquid-chromatography of brassinosteroids in plants with derivatization using 9-phenanthreneboronic acid / K.Gamoh, K.Omote, N.Okamoto, S.Takatsuto // *J. Chromatogr.* - 1989. - Vol. 469. - P. 424-428.
275. Ferroceneboronic acid as a derivatization reagent for the determination of brassinosteroids by high-performance liquid-chromatography with electrochemical detection / K.Gamoh, H.Sawamoto, S.Kakatsuto e. a. // *J. Chromatogr.* - 1990. - Vol. 515. - P. 227-231.
276. Gamoh K., Brooks C.J.W. Stability and reversed-phase liquid-chromatographic studies of cyclic boronates // *Anal. Sci.* - 1993. - Vol. 9, № 4. - P. 549-552.
277. Monitoring brassinosteroid biosynthetic enzymes by fluorescent tagging and HPLC analysis of their substrates and products / J.Winter, B.Schneider, S.Meyenburg e. a. // *Phytochemistry.* - 1999. - Vol. 51, № 2. - P. 237-242.
278. Analysis of brassinosteroids by liquid chromatography mass spectrometry / K.Gamoh, M.C.Prescott, L.J.Goad, S.Takatsuto // *Bunseki Kagaku.* - 1996. - Vol. 45, № 6. - P. 523-527.
279. Analysis of underivatized brassinosteroids by HPLC/APCI-MS. Occurrence of 3-epibrassinolide in *Arabidopsis thaliana* / O.V.Konstantinova, A.P.Antonchick, N.J.Oldham, V.N.Zhabinskii, V.A.Khripach, B.Schneider // *Collect. Czech. Chem. Commun.* - 2001. - Vol. 66, № 12. - P. 1729-1734.

280. Liquid chromatography mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization of free brassinosteroids / K.Gamoh, H.Abe, K.Shimada, S.Takatsuto // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* - 1996. - Vol. 10, № 8. - P. 903-906.
281. Determination of traces of natural brassinosteroids as dansylaminophenylboronates by liquid-chromatography with fluorimetric detection / K.Gamoh, N.Okamoto, S.Takatsuto, I.Teijima // *Anal. Chim. Acta.* - 1990. - Vol. 228, № 1. - P. 101-105.
282. Gamoh K., Takatsuto S., Ikekawa N. Effective separation of C-24 epimeric brassinosteroids by liquid-chromatography // *Anal. Chim. Acta.* - 1992. - Vol. 256, № 2. - P. 319-322.
283. Biosynthesis of brassinosteroids in seedlings of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum*, and *Oryza sativa* / H.Suzuki, S.Fujioka, S.Takatsuto e. a. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* - 1995. - Vol. 59, № 2. - P. 168-172.
284. Kamao M., Okano T. Novel metabolic pathways of vitamin D<sub>3</sub> - identification of C-3 epimerization and C-25 dehydration pathways and biological activity of novel metabolites // *J. Health Sci.* - 2003. - Vol. 49, № 4. - P. 260-266.
285. Secasterone, the first naturally-occurring 2,3-epoxybrassinosteroid from *Secale cereale* / J.Schmidt, B.Spengler, T.Yokota e. a. // *Phytochemistry.* - 1995. - Vol. 38, № 5. - P. 1095-1097.
286. 24-Epi-secasterone and 24-epi-castasterone from *Lychnis viscaria* seeds / A.Friebe, A.Volz, J.Schmidt e. a. // *Phytochemistry.* - 1999. - Vol. 52, № 8. - P. 1607-1610.
287. Schroepfer G.J. Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes // *Physiol. Rev.* - 2000. - Vol. 80, № 1. - P. 361-554.
288. Исследование биосинтеза эпоксибрасиностероидов / А.П.Антончик, Б.Шнайдер, В.Н.Жабинский, О.В.Константинова, В.А.Хрипач // *Химия, структура и функции биомолекул: Тез. докл. науч. конф.- Минск.* - Весці НАН Беларусі - 2004. - № 2. - С. 23.
289. Biosynthesis of 2,3-epoxybrassinosteroids in rye seedlings / A.P. Antonchick, B.Schneider, O.V.Konstantinova, V.N.Zhabinskii, V.A.Khripach // *20th Conf. on Isoprenoids: Book of Abstracts.* - Liberec. - Chem Listy. - 2003. - Vol. 97 - P. s279-280.
290. Yokota T., Arima M., Takahashi N. Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall // *Tetrahedron Lett.* - 1982. - Vol. 23, № 12. - P. 1275-1278.
291. Aburatani M., Takeuchi T., Mori K. Synthesis of brassinolide 1. Structural revision of the acetal intermediates in brassinolide synthesis // *Agric. Biol. Chem.* - 1985. - Vol. 49, № 12. - P. 3557-3562.
292. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp Cell Res.* - 1968. - Vol. 50, № 1. - P. 151-158.

293. Linsmaier E.M., Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* - 1965. - Vol. 18, № 1. - P. 100-127.
294. Synthesis of [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]brassinosteroids from 23,24-bisnorcholenic acid methyl ester / A.P.Antonchick, B.Schneider, V.N.Zhabinskii, V.A.Khripach // *Steroids.* - 2004. - Vol. 69, № 10. - P. 617-628.