

УДК 547.466+546.597+542.91

Синтез биологически активных тритерпеновых соединений на основе бетулина

**Б.Н. Кузнецов^{а,б*}, В.А. Левданский^{а,б},
С.А. Кузнецова^{а,б}, Т.И. Когай^б**

^а *Институт химии и химической технологии СО РАН
Россия 660049, Красноярск, ул. К. Маркса, 42*

^б *Сибирский федеральный университет,
Россия 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79¹*

Received 2.12.2011, received in revised form 9.12.2011, accepted 16.12.2011

Описаны разработанные авторами новые способы синтеза тритерпеновых соединений на основе биологически активного бетулина, перспективных для создания новых лекарственных средств. Разработан усовершенствованный способ получения бетулиновой кислоты восстановлением бетулоната натрия NaBH₄ в среде воды. Предложен способ восстановления бетулоновой кислоты в бетулиновую в условиях межфазного катализа, обеспечивающий повышение выхода бетулиновой кислоты до 99 %. С использованием карбодимидного метода синтезированы циклогексиламид бетулиновой кислоты (выход 89 %), пропиламид бетулиновой кислоты (выход 84 %), третбутиловый эфир валинбетулиновой кислоты (выход 83 %), третбутиловый эфир тирозинбетулиновой кислоты (выход 84 %). Разработаны новые одностадийные способы получения диацетата бетулина путем ацетилирования бересты березы и аллобетулина путем кипячения в толуоле или п-ксилоле бересты, пропитанной серной или ортофосфорной кислотой.

Ключевые слова: бетулин, береста, синтез, бетулиновая кислота, амидные и аминные производные бетулиновой кислоты, диацетат бетулина, аллобетулин.

Введение

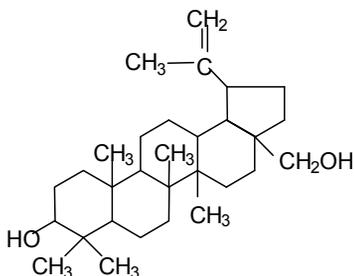
Актуальна задача исследования и разработки новых более эффективных и экологически безопасных методов синтеза из субстратов растительного происхождения востребованных биологически активных веществ.

* Corresponding author E-mail address: inm@icct.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

Синтетические трансформации природных биологически активных соединений стали основой активно развивающегося научного направления тонкого органического синтеза и медицинской химии. Наибольшее внимание исследователей привлекают нативные соединения, о биологической активности которых имеются достоверные данные. Соединениями, сочетающими доступность с ценной биологической активностью, являются тритерпеноиды лупанового ряда – бетулин и его производные (бетулоновая и бетулиновая кислота, ацилы и эфиры бетулина, аллобетулин и др.) [1–13].

Бетулин (бетулинол) весьма доступное природное соединение. Его содержание в бересте березы достигает 35 % вес. [14].



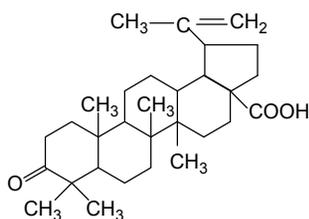
Функциональные группы в бетулине – первичная и вторичная гидроксильные группы и двойная связь в изопрпенильной группе у пятичленного кольца. В соответствии с этим бетулин способен вступать в реакции, характерные для спиртов (этерификации, окисления), и реакции с участием изопрпенильной группы (изомеризации, восстановления, окисления).

Бетулин растворим в пиридине, тетрагидрофуране, диметилсульфоксиде. В большинстве других органических растворителей бетулин имеет низкую растворимость, а в воде он практически не растворим.

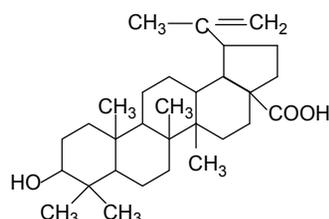
Как следует из анализа патентной и научной литературы, для выделения бетулина из березовой коры в основном используют экстракционные методы [15]. В качестве экстрагентов применяют различные полярные и неполярные органические растворители. Однако растворимость бетулина в них весьма ограничена (в среднем составляет около 10 г/л). Другим недостатком экстракционных методов является то, что вместе с бетулином из коры извлекаются другие экстрактивные вещества. Поэтому для очистки бетулина требуется многократная перекристаллизация, что снижает его выход. Кроме того, многие используемые растворители токсичны, опасны для окружающей среды, и необходимость их утилизации повышает стоимость получаемого бетулина.

В ИХХТ СО РАН разработаны новые способы получения бетулина, диацетата бетулина, дипропионата бетулина, аллобетулина непосредственно из бересты березы, которые защищены патентами РФ [7, 10, 11, 13]. В настоящее время Институтом разрабатывается промышленная технология получения бетулина из коры березы, что создает надежную сырьевую базу для промышленного синтеза его востребованных биологически активных производных.

К последним относятся бетулоновая и бетулиновая кислоты, на основе которых в настоящее время разрабатываются новые лекарственные средства для борьбы с вирусными инфекциями (включая ВИЧ) и онкологическими заболеваниями [16–18].

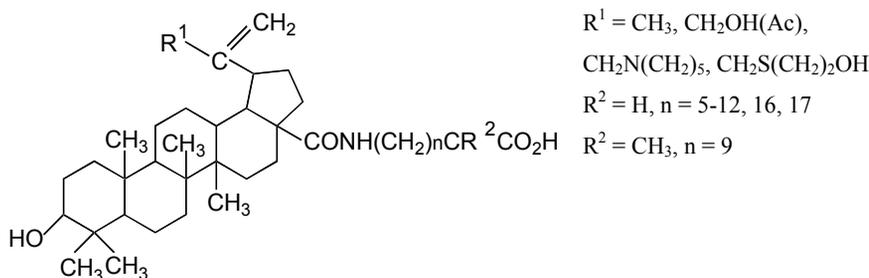


Бетулоновая кислота



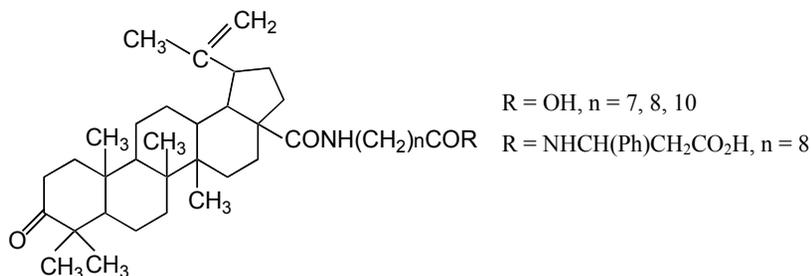
Бетулиновая кислота

Хотя о биологической активности бетулиновой кислоты известно давно, только в 1999 г. запатентован способ ингибирования роста раковых клеток при помощи бетулиновой кислоты [17]. В обзоре [16], посвященном последним достижениям лаборатории природных продуктов Северной Каролины (США), показано, что производные бетулиновой кислоты превосходят активность 3'-азидо-3'-дезокситимидина – первого средства против ВИЧ. Анализ основных работ, выполненных как за рубежом, так и в России по изучению биологической активности бетулина и его производных, а также синтезу производных бетулоновой и бетулиновой кислот, представлен в обзоре, вышедшем в 2005 г. [19]. В обсуждаемом обзоре подробно рассмотрен синтез эфиров, пептидов и других родственных соединений бетулина, бетулоновой и бетулиновой кислот. Большое внимание уделено синтезу пептидов бетулоновой и бетулиновой кислот.



Стимулирующее влияние на развитие этих работ оказало сообщение о высокой антиВИЧ-активности дипептида бетулиновой кислоты, а также обширной группы моно- и дипептидов ряда 28-карбоксиупана.

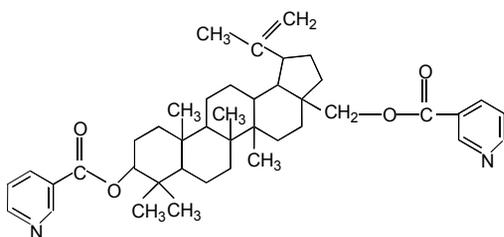
Синтезирована серия амидов бетулоновой кислоты с эфирами аминокислот и алифатическими и гетероциклическими аминами. На основе бетулоновой кислоты синтезированы моно- и дипептиды, обнаружившие ценную биологическую активность [19]:



Синтезирована большая группа моно-, ди- и тригликозидов бетулина.

На основании большого числа экспериментальных исследований, проведенных в последние годы, получены обнадеживающие данные по взаимосвязи «структура – активность». Например, для дигидробетулиновой кислоты обнаружена более высокая антиВИЧ-1-активность, чем для бетулоновой. Механизм антиВИЧ-эффекта бетулиновой кислоты и ее производных связан с блокированием стадии слияния внешней оболочки вируса с клеточной мембраной, т.е. она активна на ранних стадиях репликационного цикла ВИЧ, и это обстоятельство выгодно отличает их от веществ нуклеозидной природы, непосредственно влияющих на репликационные процессы нуклеиновой кислоты вируса.

Противовирусная активность производных лупановых тритерпеноидов сочетается с выраженным иммуностимулирующим действием. Так, диникотинат бетулина стимулирует выработку антителообразующих клеток, способствует восстановлению уровня маркерных ферментов сыворотки крови, щелочной фосфатазы и билирубина. Кроме того, данное соединение уменьшает интенсивность процесса пероксидного окисления липидов в 1,8 раза и обладает тем самым антиоксидантными свойствами. Высокие гепатопротекторные свойства превышают активность официально разрешенного препарата Silibinin. Диникотинат бетулина предотвращает развитие лучевой болезни [20].



Среди производных бетулина и бетулоновой кислоты выявлены высокоактивные ингибиторы вируса герпеса. Высокоактивные соединения обнаружены среди амидов, уреидов и замещенных бензальдегидов. Показана активность бетулина и его производных в отношении вируса гриппы А в широкой области концентраций. Наиболее активными оказались 3-оксим- и амид-бетулоновой кислоты. Введение дополнительных CONH– и NH–CONH–групп в положение С-28 молекул бетулоновой и бетулиновой кислот потенцирует их противовирусную активность.

Проведенный анализ научных работ по синтезу различных классов соединений, содержащих бетулиновый фрагмент, показал, что наиболее привлекательными, на наш взгляд, являются соединения, содержащие амидную и пептидную группировку. Это в первую очередь связано с тем, что указанный класс соединений обладает широким спектром биологической активности и не имеет побочных негативных действий.

В данной статье описаны разработанные авторами новые способы синтеза тритерпеновых соединений на основе бетулина, перспективных для создания новых лекарственных средств.

Усовершенствование метода синтеза бетулиновой и бетулоновой кислот из бетулина [10, 12, 21–23]

Для превращения бетулина в бетулоновую кислоту в литературе предложено использовать несколько окислителей: азотную кислоту, перманганат калия, хромовую кислоту и её

производные. Хороших результатов добиваются в случае окисления бетулина оксидом хрома (VI) в различных растворителях. Наиболее удобным методом является прибавление водного раствора серной кислоты, содержащего оксид хрома (VI), (известного как реактив Джонса), к ацетоновому раствору соединения, подлежащего окислению [24]. Восстановленная соль хрома частично осаждается, ацетоновый раствор отделяется декантацией, что облегчает обработку и выделение полученного продукта. Окисление бетулина реактивом Джонса сопровождается рядом побочных реакций. При отклонении условий проведения окисления от оптимальных побочные реакции конкурируют с основным процессом, и это существенно снижает выход целевого продукта. Литературные данные по окислению бетулина реактивом Джонса носят бессистемный характер. Отсутствуют сведения о соотношении бетулина и хромового ангидрида, соотношении воды и серной кислоты, времени процесса окисления. Нами проведена работа по изучению влияния ряда факторов на выход бетулоновой кислоты при окислении бетулина оксидом хрома (VI).

Установлено, что параметрами, существенно влияющими на выход бетулоновой кислоты, являются: время окисления и соотношение бетулина и оксида хрома (VI). Время окисления изменяли от одного до семи часов при фиксированном соотношении реагентов (на 1 моль бетулина использовали 3 моля CrO_3 в виде стандартного реактива Джонса). Температура реакции (0°C) во всех опытах была постоянной. Установлено, что увеличение времени реакции от одного до четырёх часов приводит к увеличению выхода бетулоновой кислоты с 15,4 до 54,5 %. Дальнейшее увеличение времени окисления вызывает резкое снижение выхода бетулоновой кислоты.

При увеличении количества оксида хрома (VI) от одного до семи молей на моль бетулина выход бетулоновой кислоты увеличивается от 17,5 до 55,0 %, причём время окисления уменьшается от 4 до 0,5 ч.

Известен ряд способов получения бетулиновой кислоты из бетулина, которые можно разделить на две группы. К первой группе способов относятся многостадийные схемы, позволяющие избежать изменения пространственной ориентации гидроксильной группы в положении 3 (биологически активный 3β -изомер) [25, 26]. Вторая группа методов представлена двухстадийными схемами, позволяющими достичь желаемого результата более коротким путём, но с превращением небольшого количества целевого продукта (около 15 %) в биологически неактивную 3α -гидрокси-20(29)-лупаен-28-овую кислоту (3α -изомер). Преимущества этой группы методов связаны не только с сокращением числа стадий процесса. В ряде из них суммарный выход целевого продукта остается выше из-за уменьшения числа стадий даже с учётом снижения выхода 3β -изомера вследствие появления 3α -изомера.

В двухстадийных схемах получения бетулиновой кислоты бетулин вначале окисляют оксидом хрома (VI) в бетулоновую кислоту, которую затем восстанавливают боргидридом натрия в спиртах или тетрагидрофуране [27, 28]. Процесс очистки бетулоновой кислоты состоит в превращении её в бетулонат натрия, выделении и очистки полученной соли органическими растворителями с последующим превращением бетулоната натрия в бетулоновую кислоту.

Нами усовершенствован метод получения бетулиновой кислоты, который отличается от известных двухстадийных способов тем, что восстанавливают боргидридом натрия не бету-

лоновую кислоту, а бетулонат натрия, образующийся на стадии выделения и очистки бетулоновой кислоты [5]. В результате этого удаётся сократить несколько операций по выделению бетулоновой кислоты. Отличительной особенностью усовершенствованного метода синтеза бетулиновой кислоты из бетулина является то, что бетулонат натрия восстанавливают до бетулиновой кислоты боргидридом натрия в среде воды при комнатной температуре. Проведение восстановления в воде, а не в спиртах или тетрагидрофуране удешевляет процесс, делает его более экологичным и безопасным.

Была осуществлена оптимизация условий реакции восстановления бетулоната натрия боргидридом натрия в воде. Варьировалось мольное соотношение бетулоната натрия и боргидрида натрия от 1:7 до 1:10, концентрация боргидрида натрия от 1 до 6 % и гидроксида натрия от 0,01 до 0,05 %. Установлено, что наилучший результат достигается при концентрации боргидрида натрия 6 % и мольном соотношении реагентов 1:8. Изменение концентрации гидроксида натрия не влияет на скорость восстановления и на выход целевого продукта, который составляет 79,6 %.

Выделенную бетулиновую кислоту кристаллизовали из метанола. Продукт после перекристаллизации состоял из смеси 3 β - и 3 α -гидрокси-изомеров в соотношении 5:1 по данным ПМР спектроскопии: 3,22 (дубл. дубл. 1H, 3H 3 β -изомер); 3,44 (трипл. 1H, 3H 3 α -изомер). После дополнительной очистки получен чистый 3 β -гидрокси-изомер с выходом 66,3 %.

Установлено, что бетулоновая кислота также восстанавливается в воде боргидридом натрия при комнатной температуре с образованием бетулиновой кислоты. Восстановление бетулоновой кислоты проводили без добавления гидроксида натрия. Общий выход смеси 3 β - и 3 α -гидрокси-изомеров бетулиновой кислоты составил 81,5 %.

Таким образом, анализ полученных экспериментальных данных по окислению бетулина реактивом Джонса в ацетоне показал, что целесообразно проводить окисление в течение 0,5 ч при мольном соотношении бетулин:CrO₃ – 1:7 и температуре 0 °С. Такие условия проведения окисления позволяют получать аналитически чистую бетулоновую кислоту с выходом 55 %.

Оптимизированы условия проведения реакции восстановления бетулоновой кислоты в бетулиновую кислоту в условиях межфазного катализа [6]. Установлено, что лучшим растворителем для данной реакции является бензол. Катализаторы межфазного переноса, а именно тетрабутиламмоний-бромид и триэтилбензиламмоний-хлорид в системе бензол – вода, существенно повышают эффективность восстановления, что позволяет синтезировать бетулиновую кислоту с выходом 98,5–99,3 %.

В результате проделанной работы удалось значительно улучшить двухстадийный процесс получения бетулиновой кислоты из бетулина и получить бетулиновую кислоту с выходом 54,6 %.

Синтез амидных производных бетулиновой кислоты [4]

Амидные производные бетулиновой кислоты были получены с использованием карбодиимидного метода, широко используемого в пептидном синтезе [26]. Суть метода заключается в следующем: N,N'-дициклогексилкарбодиимид прибавляют к раствору хлороформа,

содержащему бетулиновую кислоту и амин. При взаимодействии его с бетулиновой кислотой образуется бетулонат дициклогексилмочевины, который при взаимодействии с амином дает амид бетулиновой кислоты. При этом в осадок выпадает трудно растворимая N,N'-дициклогексилмочевина, а продукт реакции циклогексиламид бетулиновой кислоты остается в растворе и выделяется после удаления растворителя.

Получение циклогексиламида бетулиновой кислоты

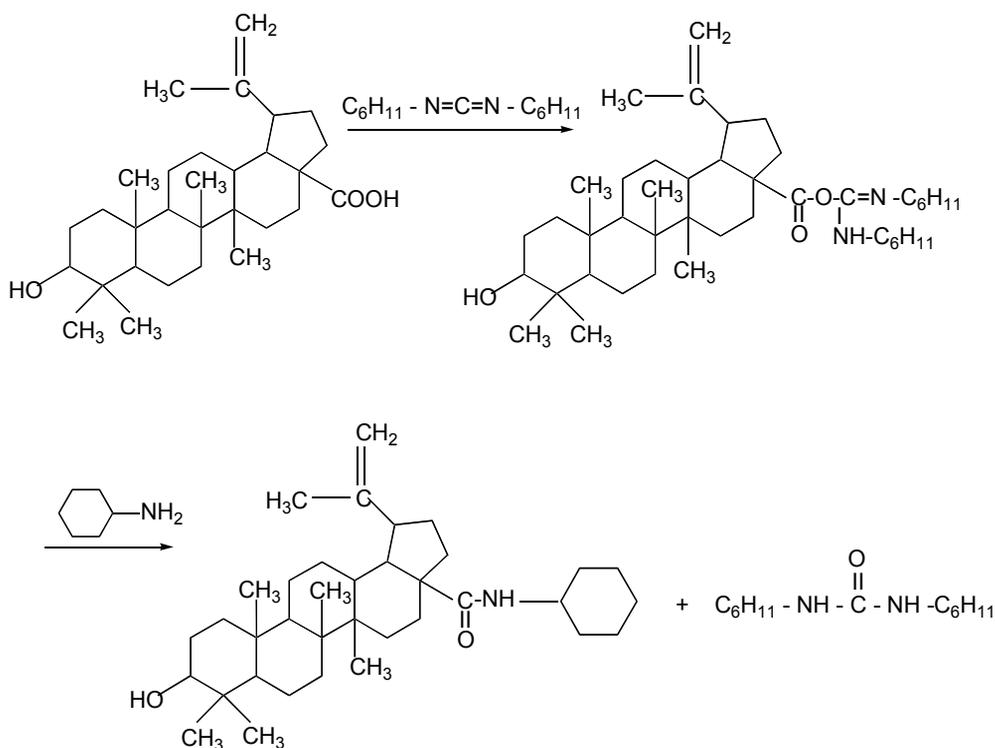


Схема синтеза циклогексиламида бетулиновой кислоты

Синтез циклогексиламида бетулиновой кислоты осуществляли следующим образом: к раствору бетулиновой кислоты в хлороформе добавляют циклогексиламин и N,N'-дициклогексилкарбодиимид при постоянном перемешивании и охлаждении до 5–10 °С в течение 6 ч. Осадок N,N'-дициклогексилмочевины отфильтровывают и раствор продукта реакции в хлороформе промывают последовательно 1н соляной кислотой, водой, 1н раствором бикарбоната калия, еще раз водой и высушивают безводным сульфатом натрия. Растворитель отгоняют в вакууме при 35–40 °С и оставшееся вещество перекристаллизовывают из метанола. Выход циклогексиламида бетулиновой кислоты составляет 89 %, T_{пл} 218 °С. Состав циклогексиламида бетулиновой кислоты подтвержден элементным анализом. Найдено: С, % 80,31, 80,56; N, % 2,78, 2,51; C₃₆H₅₉O₂N. Вычислено: С, % 80,45; N, % 2,61. Контроль за ходом реакции и чистотой полученного соединения осуществляли методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254 с использованием элюента – смеси хлороформ – спирт (10 : 1).

Получение пропиламида бетулиновой кислоты

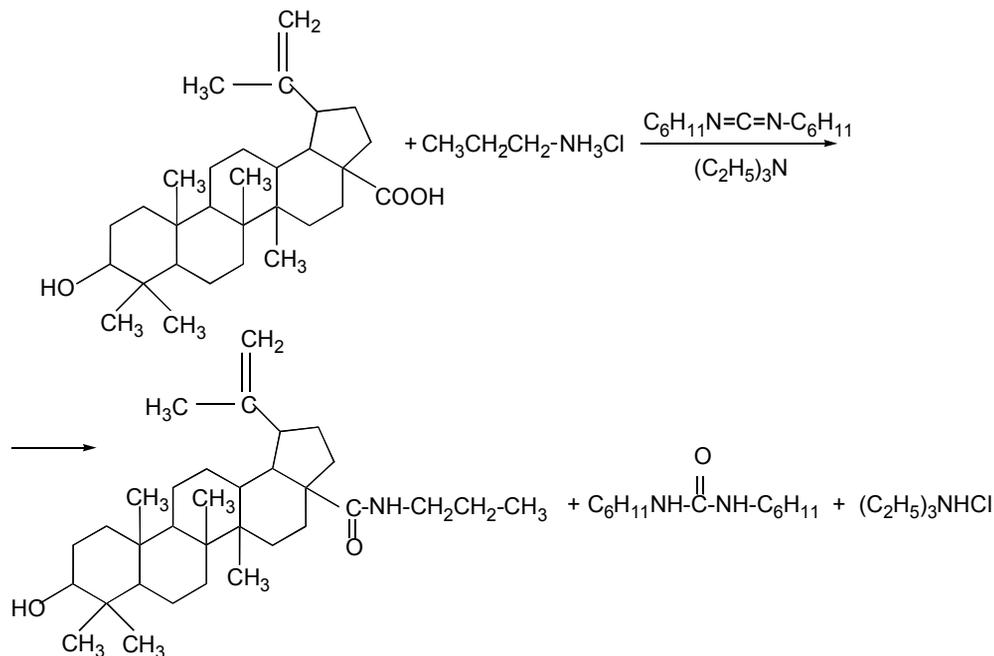


Схема синтеза пропиламида бетулиновой кислоты

К раствору бетулиновой кислоты в хлористом метилене добавляли последовательно хлоргидрат пропиламина и триэтиламин. Затем при постоянном перемешивании и охлаждении до 5–10 °С к реакционной смеси добавляли N,N'-дициклогексилкарбодиимид. Постепенно начинает выпадать осадок N,N'-дициклогексилмочевины. Реакционную массу перемешивают при комнатной температуре еще 8–10 ч. Осадок N,N'-дициклогексилмочевины отделяют фильтрованием. Раствор продукта реакции в хлористом метилене промывают последовательно 1н соляной кислотой, водой, 1н раствором бикарбоната натрия и еще раз водой и высушивают безводным сульфатом натрия. Хлористый метилен отгоняют в вакууме при температуре до 40 °С и полученный продукт перекристаллизовывают из метанола. Выход пропиламида бетулиновой кислоты составил 84 %, $T_{\text{пл}} = 193$ °С. Состав пропиламида бетулиновой кислоты подтвержден элементным анализом. Найдено: С, % 79,39, 79,57; N, % 2,71, 2,87; $\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{O}_2\text{N}$. Вычислено: С, % 79,52; N, % 2,81. Контроль за ходом реакции и чистотой полученного соединения осуществляли методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254 с использованием элюента – смеси хлороформ – спирт (10 : 1).

Структура циклогексиламида бетулиновой кислоты и пропиламида бетулиновой кислоты подтверждена данными ИК, ЯМР ¹H-спектроскопии.

Синтез аминокислотных производных бетулиновой кислоты [4]

Синтез аминокислотных производных бетулиновой кислоты, содержащих третбутиловый эфир валина (I) и третбутиловый эфир тирозина (II), осуществлен карбодиимидным методом [29] по следующей схеме.

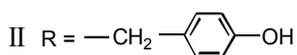
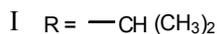
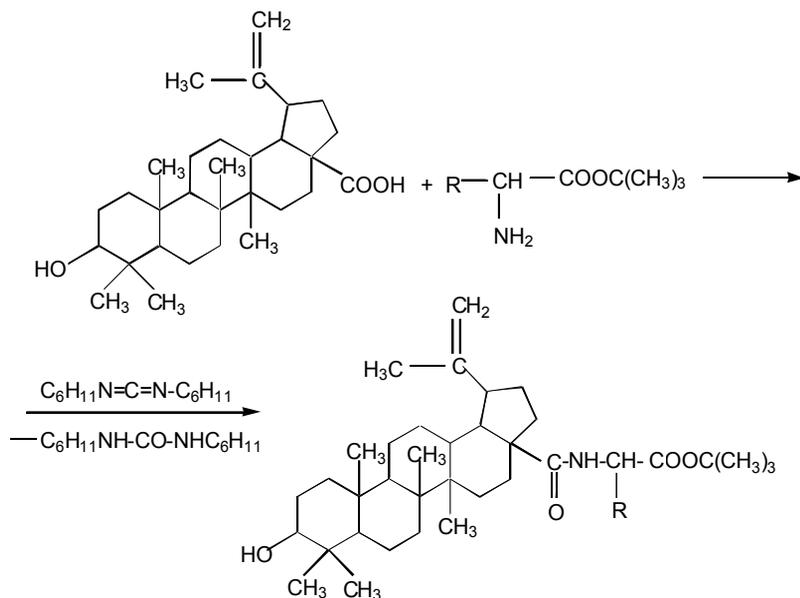


Схема синтеза аминокислотных производных бетулиновой кислоты

Получение производного бетулиновой кислоты с третбутиловым эфиром валина. К раствору бетулиновой кислоты в хлористом метиле добавляют третбутиловый эфир валина и реакционную массу при перемешивании охлаждают до 2–5 °С. К реакционной массе добавляют N,N'-дициклогексилкарбодиимид при постоянном перемешивании и охлаждении до 5 °С. Хотя осадок N,N'-дициклогексилмочевины начинает выпадать в течение часа после добавления карбодиимида, смесь еще перемешивают 8-10 ч при комнатной температуре, ход реакции контролируют методом ТСХ на пластинках Silufol в системе хлороформ-метанол, взятых в соотношении 20:1. Реакционную смесь охлаждают до 0 °С и отфильтровывают кристаллы N,N'-дициклогексилмочевины. Фильтрат, содержащий продукт реакции, упаривают при пониженном давлении и остаток растворяют в эфире. Эфирный раствор промывают разбавленной соляной кислотой, водой, 1 н раствором бикарбоната натрия и еще раз водой, высушивают безводным сульфатом натрия и выпаривают в вакууме досуха. Остаток перекристаллизовывают из метилового спирта, выход 1,26 г (83 %), T_{пл} 197-198 °С. Состав третбутилового эфира валинбетулиновой кислоты подтвержден элементным анализом. Найдено: С, % 76,93, 76,75; N, % 2,21, 2,38. C₃₉H₆₅O₄N. Вычислено: С, % 76,85; N, % 2,30.

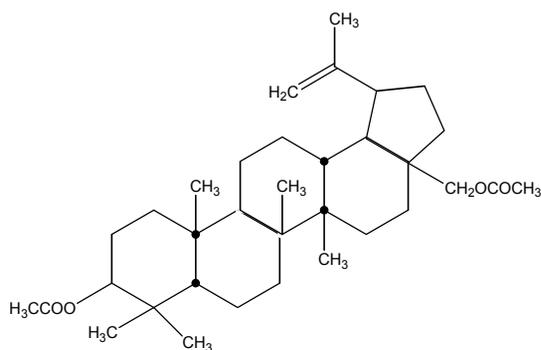
Получение производного бетулиновой кислоты с третбутиловым эфиром тирозина. К реакционной смеси, содержащей бетулиновую кислоту в хлористом метиле, добавляют третбутиловый эфир тирозина и реакционную массу при перемешивании охлаждают до 2–5 °С. При постоянном охлаждении и перемешивании к реакционной смеси добавляют N,N'-дициклогексилкарбодиимид. Осадок N,N'-дициклогексилмочевины начинает выпадать в те-

ние 2–3 ч после прибавления карбодиимида. Реакционную смесь перемешивают 48 ч при комнатной температуре, ход реакции контролируют методом ТСХ на пластинках Silufol в системе хлороформ-метанол, взятых в соотношении 20:1. Раствор охлаждают до 0 °С и отфильтровывают осадок N,N'-дициклогексилмочевины. Раствор, содержащий продукт реакции, упаривают при пониженном давлении и остаток растворяют в эфире. Эфирный раствор последовательно промывают соляной кислотой, водой, 1 н раствором бикарбоната натрия и еще раз водой, высушивают безводным сульфатом натрия и выпаривают в вакууме досуха. Осадок перекристаллизовывают из смеси метанол-гексан, взятой в соотношении 4:1. Выход продукта реакции составил 84 %, $T_{пл}$ 185-186 °С. Состав полученного соединения подтвержден элементным анализом. Найдено: С, % 76,38, 76,52; N, % 2,11, 2,04. $C_{43}H_{65}O_5N$. Вычислено: С, % 76,44; N, % 2,07.

Состав и строение аминокислотных производных бетулиновой кислоты с третбутиловым эфиром валина и третбутиловым эфиром тирозина доказаны результатами элементного анализа, ИК и ЯМР H^1 .

Синтез диацетата бетулина и аллобетулина непосредственно из бересты коры березы [7, 11, 13, 30]

Диацетат бетулинола [$3\beta,28$ -диацетокси-луп-20(29)-ен(1)] обладает гиполипидемическими и желчегонными свойствами [31]. Кроме того, диацетат бетулинола является сырьем для многих органических синтезов, таких как получение бетулиновой кислоты, серопроизводных бетулина, синтез аминокислотных производных диацетата бетулина и др.



Диацетат бетулина

Известные способы получения диацетата бетулина основаны на классических реакциях ацетилирования бетулина, предварительно выделенного из коры березы [32, 33]. Как правило, они являются многостадийными и нередко требуют использования токсичных и дорогостоящих реагентов. Известно, что попытка синтеза диацетата бетулина прямой этерификацией бетулина уксусной кислотой без использования минеральной кислоты в качестве катализатора не позволила получить целевой продукт высокого качества. Кроме того, несмотря на постоянное усовершенствование способов извлечения бетулина из бересты, процесс его получения остается технически сложным. Все это удорожает синтез диацетата бетулина и не позволяет достичь его высокого выхода в расчете на исходное содержание бетулина в березовой коре.

Получение диацетата бетулина. Разработан новый одностадийный способ получения диацетата бетулина непосредственно из бересты коры березы.

Синтез диацетата бетулина проводили путем обработки бересты, измельченной до фракции 2–5 мм и высушенной при температуре 105 °С до влажности менее 2 %, ледяной уксусной кислотой при температуре ее кипения в круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником. После завершения реакции уксусную кислоту отгоняли на роторном испарителе до 1/10 объема, а остаток выливали в пятикратное количество воды. Выпавший осадок отфильтровывали, многократно промывали на фильтре дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Перекристаллизацию полученного продукта проводили из этанола с применением активированного угля марки ОУ-Г.

Анализ и идентификацию полученных продуктов и перекристаллизованного диацетата бетулина исследовали на хромато-масс-спектрометре GCD Plus (Hewlett Packard, США) в Центре коллективного пользования Красноярского научного центра.

Применяли капиллярную колонку HP-5S, длина 30 м, диаметр 0,25 мм. Содержание компонентов вычисляли по площадям газохроматографических пиков. Качественный анализ проводили, сравнивая времена удерживания и полных масс-спектров с соответствующими данными библиотеки масс-спектрометра.

ИК-спектроскопическое исследование полученного продукта выполнено на FTIR-Фурье-спектрометре Vector 22 (Bruker). Диацетат бетулина прессовали с бромистым калием в специальной матрице. Обработку спектральной информации проводили с использованием программы OPUS/Y (версия 2.2). ЯМР-спектроскопическое исследование веществ было произведено на спектрометре Bruker DPX-200 при частоте 200 МГц (¹H), растворитель – CDCl₃.

Элементный анализ экстрактов проводили с использованием элементного анализатора FLASH™ 1112.

Контроль на содержание примесей осуществлялся также с помощью ТСХ на пластинках Silufol, элюент – хлороформ : этанол (20:1).

Как следует из полученных результатов, с увеличением продолжительности экстракции бересты уксусной кислотой с 0,5 до 18 ч выход экстракта возрастает с 32,6 до 43,9 % от массы абсолютно сухой бересты. При этом содержание диацетата бетулина в продукте увеличивалось с 33,1 до 83,5 %, и одновременно уменьшалось содержание бетулина с 51,3 до 3,7 %.

Проведенные эксперименты подтверждают, что при экстракции бересты березы уксусной кислотой одновременно с извлечением бетулина и лупеола происходит и их этерификация. Через 30 мин от начала процесса содержание бетулина в экстракте составляет 51,3 лупеола – 9,2, а диацетата бетулина – 33,1 %. При продолжительности процесса более 30 мин и большом избытке уксусной кислоты (ГМ 1 : 20) равновесная реакция этерификации смещается в сторону образования эфира. Уже через 4 ч от начала процесса содержание бетулина в продукте уменьшается до 22,6 %, содержание лупеола – до 2,7 %, в то время как содержание диацетата бетулина возрастает до 67,1 %. Через 10 ч от начала процесса содержание диацетата бетулина в экстракте составляет 77,6, бетулина – 8,7, а содержание ацетата лупеола – 7,4 %.

Перекристаллизованный из этанола диацетат бетулина желтоватого цвета имеет температуру плавления 222–223 °С, что соответствует температуре плавления диацетата бетулина, полученного встречным синтезом по известным методикам [34].

На основании данных элементного анализа найдено, %: (С) 78,06; (Н) 10,2; (О) 11,9. Вычислено, %: (С) 77,6; (Н) 10,3; (О) 12,2.

Данные FTIR, ¹H ЯМР-спектроскопии и тонкослойной хроматографии (ТСХ) также идентифицируют полученный продукт как диацетат бетулина (3β,28-диацетокси-луп 20 (29)-ен), C₃₄H₅₄O₄.

ИК-спектр (ν, см⁻¹): 3070,9 (C=C); 2953,56; 2872,73 (C-H); 1739,93 (C=O); 1458,23; 1391,79; 1368,56 (C-C); 1246,14; 1151,11; 1108,63 (C-O-C).

Спектр ¹H-ЯМР(δ, м.д., J, Гц): 0.78 с (3H, CH₃), 0.82 с (3H, CH₃), 0.90 с (3H, CH₃), 0.96 с (3H, CH₃), 1.32 с (3H, CH₃), 1.61 с (3H, CH₃), 0.70-1.95 м (24H), 1.97 с (3H, COCH₃), 2.00 с (3H, COCH₃), 2.38 м (1H, C¹⁹H), 3.77 д, 4.18 д (2H, C²⁸H₂, J 11.2), 4.39 м (C³H), 4.52 с, 4.62 с (2H, C³⁰H₂).

Получение аллобетулина. Аллобетулин и его эфиры обладают разнообразной биологической активностью [19, 35]. Известные многостадийные способы синтеза аллобетулина включают стадии выделения бетулинола из бересты и его изомеризации в присутствии кислотных катализаторов. Используются двухстадийные и одностадийные способы изомеризации бетулинола в аллобетулин. Известный двухстадийный способ основан на обработке бетулинола кипящей муравьиной или уксусной кислотой в присутствии серной и последующем омылении образовавшегося формиата или соответственно ацетата аллобетулина гидроксидом калия [36]. Одностадийная изомеризация бетулинола в галогеноводородных кислотах приводит к образованию побочного продукта – 20,28-эпокси-19βH-лупан-3β-ола, что существенно снижает выход аллобетулина [37]. В одну стадию аллобетулин может быть получен в условиях гетерогенного катализа при кипячении бетулинола в дихлорметане с азотнокислым железом или хлорным железом, адсорбированным на силикагеле [38], а также изомеризацией бетулинола в присутствии растворенной или нанесенной на инертный носитель ортофосфорной кислотой [39].

При синтезе аллобетулина кислотной изомеризацией бетулинола пятичленный цикл бетулинола, содержащий изопропеную группу, изомеризуется в шестичленный цикл по схеме.

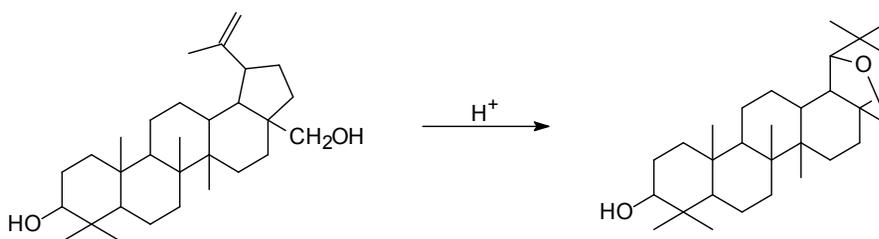


Схема изомеризации бетулина в аллобетулин

Задача исследования состояла в подборе условий, обеспечивающих совмещение процессов экстракции бетулинола из бересты и его кислотной изомеризации в аллобетулин.

Известно, что высокий выход бетулинола достигается при экстракции бересты неполярными органическими растворителями, например толуолом [40]. Показано, что при кипячении в толуоле или п-ксилоле измельченной бересты, пропитанной серной или ортофосфорной кислотой, одновременно с экстракцией бетулинола происходит и его изомеризация в аллобетулин. Выход аллобетулина из бересты составляет 21-23 масс %.

Оптимальная продолжительность одновременно протекающих процессов экстракции бетулинола толуолом и превращения его в аллобетулин составляет 4 ч. Использование в качестве растворителя п-ксилола сокращает оптимальную продолжительность процесса до 3 ч.

Установлено, что при использовании в качестве растворителя толуола с температурой кипения 110 °С максимальный выход аллобетулина (21–22 % мас.) достигается при использовании 40–50 % серной кислоты и продолжительности процесса 34 ч. Повышение температуры процесса получения аллобетулина, при замене толуола на п-ксилол с температурой кипения 138 °С, приводит к сокращению его продолжительности до 3 ч.

При использовании серной кислоты с концентрацией более 50 % выход аллобетулина падает и увеличивается количество смолообразных продуктов.

Состав аллобетулина ($C_{30}H_{50}O_2$), полученного из бересты в присутствии ортофосфорной и серной кислот, подтвержден элементным анализом, а его строение – ИК и 1H ЯМР-спектрами. В 1H ЯМР-спектре бетулинола имеются сигналы двух протонов концевой двойной связи (4,71 и 4,59 м.д.), характерной для всех производных бетулинола, имеющих изопропенильную группу.

Список литературы

1. Покровский А.Г., Плясунова О.А., Ильичева Т.Н. и др. Синтез производных растительных тритерпенов и исследование их противовирусной и иммуностимулирующей активности// Химия в интересах устойчивого развития. 2001. Т.9. С.485–491.
2. Хлебникова Т.Б., Пай З.П., Кузнецов Б.Н., Матцат Ю.В., Кузнецова С.А., Бердникова П.В., Скворцова Г.П. Каталитическое окисление бетулина и диацетата бетулина с использованием экологически безопасных окислителей// Журнал Сибирского федерального университета. Химия. 2008. №3. С. 277–285.
3. Кузнецова С.А., Васильева Н.Ю., Калачева Г.С., Титова Н.М., Редькина Е.С., Скворцова Г.П. Получение диацетата бетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантной активности (Obtaining Betulin Diacetate from Outer Birch Bark and Studying its Antioxidant Activity)// Журнал Сибирского федерального университета. Химия. 2008. №2. С. 151–165.
4. Левданский В.А. Продукты конденсации бетулиновой кислоты с некоторыми алифатическими аминами и аминокислотами// Журнал Сибирского федерального университета. Химия. 2008. №1. С. 88–96.
5. Когай Т.И. Улучшенный двухстадийный метод получения бетулиновой кислоты из бетулина// Журнал Сибирского федерального университета. Химия. 2008. №1. С. 97–104.
6. Когай Т.И., Кузнецов Б.Н. Восстановление бетулиновой кислоты в бетулиновую кислоту в условиях межфазного катализа// Химия растительного сырья. 2008. №2. С. 95–98.
7. Патент РФ № 2379314. Способ получения аллобетулина/ Левданский В.А., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н. Опубл. 20.01.2010. Бюл. № 2.
8. Патент № 2363486. Способ получения биологически активных веществ из бересты/ Левданский В.А., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н. Опубл. 10.08.2009. Бюл. № 22.

9. Патент РФ № 2415148. Способ получения дипропионата бетулинола/ Кузнецова С.А., Скурыдина Е.С., Кузнецов Б.Н., Скворцова Г.П. Опубл. 27.03.2011. Бюл. № 9.
10. Патент № 2340624. Способ получения бетулина / Левданский В.А., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н. Опубл. 10.12.2008. Бюл. № 34.
11. Патент № 2334759. Способ получения аллобетулина/ Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Редькина Е.С., Скворцова Г.П. Опубл. 27.09.2008. Бюл. № 27.
12. Патент № 2333916. Способ получения бетулоновой кислоты/ Когай Т.И., Кузнецов Б.Н. Опубл. 20.09.2008. Бюл. № 26.
13. Патент № 2324700. Способ получения диацетата бетулинола/ Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Редькина Е.С., Соколенко В.А., Скворцова Г.П. Опубл. 20.05.2008. Бюл. № 14.
14. Похило Н.Д., Уварова Н.И. Изопреноиды различных видов рода *Betula*// Химия природных соединений. 1988. № 3. С. 325–341.
15. Кислицын А.Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение: Обзор// Химия древесины. 1994. №3. С 3-28.
16. Lee Kuo-Hsiung, Morris-Natschke Susan L. Recent advances in the discovery and development of plant-derived natural products and their analogs as anti-HIV agents// Pure and Appl. Chem. 1999. V. 71. N 6. С. 1045-1051.
17. Patent US 5962527. Methods and composition for treating cancers/ Pezzuto J.M., Dac Gupta T.P., Schmidt M.L., Kuzmanoff K.M., Ling-Indeck L., Kim Darrick S.H.L. 05.10.1999.
18. Drag M., Surowiak P., Drag-Zalesinska M., Dietel M., Lage H., Oleksyszyn J. Comparison of the Cytotoxic Effects of Birch Bark Extract. Betulin and Betulinic Acid Towards Human Gastric Carcinoma and Pancreatic Carcinoma Drug-sensitive and Drug-Resistant Cell Lines// Molecules. 2009. V. 14. N4. P. 1639-1651.
19. Толстиков Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстиков А.Г. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность// Химия в интересах устойчивого развития. 2005. №13. С. 1-30.
20. Флехтер О.Б., Карачурина Л.Т., Нигматуллина Л.Р., Сапожникова Т.А., Балтина Л.А., Зарудий Ф.С., Галин Ф.З., Спирихин Л.В., Толстиков Г.А., Плясунова О.А., Покровский А.Г. Синтез и фармакологическая активность диникотината бетулина // Биоорганическая химия. 2002. Т.28. №6. С.543-550.
21. Патент № 2305106. Способ получения бетулиновой кислоты// Когай Т.И., Кузнецов Б.Н. 2007. Бюл. № 24.
22. Патент № 2271364. Способ получения бетулиновой кислоты из бетулоновой кислоты// Когай Т.И., Кузнецов Б.Н. 2006. Бюл. № 7.
23. Патент № 2246500. Способ получения бетулиновой кислоты/ Когай Т.И., Левданский В.А., Кузнецов Б.Н. 2005, Бюл. № 5.
24. Флехтер О.Б., Нигматуллина Л.Р., Балтина Л.А., Карачурина Л.Т., Галин Ф.З., Зарудий Ф.С., Толстиков Г.А., Бореко Е.И., Павлова Н.И., Николаева С.Н., Савинов О.В. Получение бетулиновой кислоты из экстракта бетулина. Противовирусная и противоязвенная активность некоторых родственных терпеноидов// Химико-фармацевтический журнал. 2002. Т. 36. № 9. С. 26–28.
25. Patent US 5804575. Methods of manufacturing betulinic acid/ Pezzuto Dg., Kim Darrick S.H.L. 1998.

26. Ruzicka L., Lamberton A.H., Christe C.W. //Helv. Chim.Acta. 1938. V.21. P. 1706–1717.
27. Kim Darrick S. H. L., Zhidong Chen, Nguen van Tuyen, Pezzuto John M. //Synth Commun. 1997. V. 27. N 9. P. 1607–1612.
28. Ле Банг Шон, Каплун А.П. и др. //Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. №10. С. 787–793.
29. Гринштейн Дж., Винниц М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1965. 821 с.
30. Патент РФ № 2374261. Способ получения аллобетулина/ Левданский В.А., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н. 2009. Бюл. № 33.
31. Василенко Ю.К., Семенченко В.Ф., Фролова Л.М. и др. Фармакологические свойства тритерпеноидов коры березы// Экспериментальная и клиническая фармакология. 1993. Т. 56. № 4. С. 53–55.
32. Патент РФ 2150473. Способ получения диацетата бетулина/ Кислицын А.Н., Патласов В.П., Чупрова В.А. 2000.
33. Patent US 6271405. Method for manufacturing betulinic acid/ Krasutsky Pavel A., Carlson Robert M., Nesterenko Vitaliy V. 2001.
34. Патент РФ № 2324700. Способ получения диацетата бетулинола/ Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Редькина Е.С., Соколенко В.А., Скворцова Г.П. Оpubл. 20.05.2008. Бюл. № 14.
35. Флехтер О.Б., Медведева Н.И., Карачурина Л.Т., Балтина Л.А., Галин Ф.З., Зарудий Ф.С., Толстиков Г.А. Синтез и фармакологическая активность эфиров бетулина, бетулиновой кислоты и аллобетулина// Химико-фармацевтический журнал. 2005. Т.39. №8. С. 9–12.
36. Barton D.H.R., Holness N.J. Triterpenoids. Part V. Some Relative Configuration in rings C.D. and E. of the β -Amyrin and the Lupeol Group of Triterpenoids// J. Chem. Soc. 1952. P. 78–92.
37. Errington S.G., Chisalberti E.L., Jefferies P.R. The Chemistry of the Euphorbiaceae. XXIV. Lup-20(29)-ene-3 β ,16 β ,28-triol from *Beyeria brevifolia* var. *brevifolia*// Austr. J. Chem. 1976. 29. N 8. P. 1809–1814.
38. Lavoie Serge, Pichette Andre, Garneau Francois-Xavier, Girard Michel, Gaudet Daniel. Synthesis of betulin derivatives with solid supported reagents (Laseve, Univ. du Quebec a Chicoutimi, 555 boul. Univ., Chicoutimi, Quebec, Canada, G7H 2B1)// Synth. Commun. 2001. 31. № 10. С. 1565–1571.
39. Патент РФ № 2174126. Способ получения аллобетулина// Кислицын А.Н., Трофимов А.Н. Оpubл. 27.09.2001.
40. Патент РФ № 2192879. Способ получения бетулина/ Стернин Ю.И. Оpubл. 20.11.2002.

Synthesis of Biologically Active Betulin-based Triterpene Compounds

**Boris N. Kuznetsov^{a,b}, Vladimir A. Levdansky^{a,b},
Svetlana A. Kuznetsova^{a,b} and Tamara I. Kogay^b**

^a *Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS,
42 st. K. Marx, Krasnoyarsk, 660049 Russia*

^b *Siberian Federal University*

79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia

Paper describes the developed by authors the novel methods of triterpene compounds synthesis from biologically active betulin, which have prospects for the design the new drugs. The improved method of betulinic acid synthesis by sodium betulonate reduction by BH_4 in water medium is developed. The method of betulonic acid reduction to betulinic acid at conditions of phase-transfer catalysis was suggested which makes it possible to increase the betulinic acid yield up to 99 %. With the use of carbodiimide methods the next derivatives of betulinic acid were synthesized: cyclohexyl amide (yield 89 %), propyl amide (yield 84 %), tertbutyl ether of valine (yield 83 %), tertbutyl ether of tyrosine (yield 84 %). The new one-step methods of synthesis of betulin diacetate by acetylation of outer bark and allobetuline synthesis by boiling in toluene or p-xylene of outer birch bark impregnated by sulphonic or orthophosphoric acids were developed.

Keywords: betulin, outer birch bark, synthesis, betulinic acid, amide and aminoderivatives of betulinic acid, betulin diacetate, allobetulin.
