Journal of Siberian Federal University. Chemistry 1 (2008) 88-96
~ ~ ~

УДК 547.466+546.597+542.91

Продукты конденсации бетулиновой кислоты с некоторыми алифатическими аминами и аминокислотами

Владимир А. Левданский*
Сибирский федеральный университет,
пр. Свободный 79, Красноярск, 660041 Россия [1]

Received 15.01.2008, received in revised form 15.03.2008, accepted 10.04.2008

При использовании карбодиимидного метода синтезированы амидные производные бетулиновой кислоты с алифатическими аминами, пропиламином и циклогексиламином и третбутиловыми эфирами аминокислот – валином и тирозином.

Ключевые слова: карбодиимидный метод, бетулиновая кислота, пропиламин, циклогексиламин, валин, тирозин.

Введение

Пентациклические тритерпеноиды ряда лупана - наиболее распространенная группа веществ, найденных во внешней коре различных видов берез. Одним из представителей этого класса веществ служит бетулин, содержание которого в бересте может достигать более 30 %. Бетулин проявляет антисептические свойства, находит применение в парфюмерно-косметической промышленности, считается хорошим эмульгатором для систем, включающих различные жиры, масла и воду. Недавно было установлено, что бетулиновая кислота, синтезируемая из бетулина, подавляет рост меланомы и других раковых клеток [1].

В последнее время разработаны эффективные способы получения бетулоновой и бетулиновой кислот из бетулина, что открывает широкие возможности для их практического использования. Бетулоновая и бетулиновая кислоты обладают высокой биологической активностью, могут использоваться в медицинской, парфюмерно-косметической и других отраслях промышленности, а также как исходные вещества для синтеза различных классов медицинских препаратов [2-4]. Наиболее доступное производное бетулина – бетулоновая кислота – обладает широким спектром биологической активности [5]. В работах [5-7] показано, что производные бетулоновой кислоты, содержащие у С-28 фрагменты аминов и аминокислот, представляют интерес как биологически активные агенты. В связи с вышеизложенным синтез пептидных соединений, содержащих в своей молекуле бетулиновый фрагмент, весьма актуален в плане разработки и испытания совершенно нового класса биологически активных веществ и медицинских препаратов.

Цель работы – синтез новых производных бетулиновой кислоты с алифатическими аминами, пропиламином и циклогексиламином, и

* Corresponding author E-mail address: inm@icct.ru
1 © Siberian Federal University. All rights reserved

третбутиловыми эфирами аминокислот – валином и тирозином.

Экспериментальная часть

ИК-спектры записаны на Фурье ИК-спектрометре Vector-22 фирмы Bruker в таблетках KBr, спектры H^1ЯМР сняты на спектрометре Bruker AM-400 (200 МГц) в дейтерохлороформе. В качестве внутреннего стандарта использован остаточный сигнал протонов хлороформа (δH=7,30 м.д).

Контроль за ходом реакции и чистотой соединений осуществляли методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254 с использованием системы растворителей хлороформ-метанол-муравьиная кислота (100:2:0,5), проявление пластинок осуществляли в парах йода. Элементный анализ выполнен на элементном анализаторе Flash E A™-1112 (Thermo Quest Italia).

Бетулин выделен из бересты берёзы [8]. Окисление бетулинола до бетулоновой кислоты проводили хромовым ангидридом в уксусной кислоте [9], а восстановление бетулоновой кислоты в бетулиновую - боргидридом натрия в тетрагидрофуране [10].

Получение циклогексиламида бетулиновой кислоты

Синтез циклогексиламида бетулиновой кислоты осуществляли следующим образом: к раствору 1,14 г (0,0025 моля) бетулиновой кислоты в 40 мл хлороформа (предварительно высушенного и очищенного) добавляют 0,3 г (0,003 моля) циклогексиламина. К реакционной смеси добавляют 0,62 г (0,003 моля) N,N'-дициклогексилкарбодиимида при постоянном перемешивании и охлаждении до 5-10°С. По истечении 1 ч начинает выпадать осадок N,N'-дициклогексилмочевины. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре еще 5 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.

Получение пропиламида бетулиновой кислоты

К раствору 1,14 г (0,0025 моля) бетулиновой кислоты в 50 мл очищенного хлористого метилена добавляли последовательно 0,27 г (0,003 моля) хлоргидрата пропиламина и 0,30 г (0,003 моля) триэтиламина. При постоянном перемешивании и охлаждении до 5-10°С к реакционной смеси добавляли 0,62 г (0,003 моля) N,N'-дициклогексилкарбодиимида. 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 %, $T_{пл}$ = 193°С. Состав пропиламида бетулиновой кислоты подтвержден элементным анализом.

Третбутиловые эфиры аминокислот – валина и тирозина - были получены известным способом [11].

Получение производного бетулиновой кислоты с третбутиловым эфиром валина

К раствору 1,14 г (0,0025 моля) бетулиновой кислоты в 25 мл очищенного хлористого метилена добавляют 0,52 г (0,003 моля) третбутилового эфира валина и реакционную массу при перемешивании охлаждают до 2-5°С. К реакционной массе добавляют 0,62 г (0,003 моля) N,N`-дициклогексилкарбодиимида 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. 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.

Получение производного бетулиновой кислоты с третбутиловым эфиром тирозина

К реакционной смеси, содержащей 1,14 г (0,025 моля) бетулиновой кислоты в 30 мл очищенного хлористого метилена, добавляют 0,52 г (0,003 моля) третбутилового эфира тирозина и реакционную массу при перемешивании охлаждают до 2-5°С. При постоянном охлаждении и перемешивании к реакционной смеси добавляют 0,62 г (0,003 моля) N,N`-дициклогексилкарбодиимида. Осадок N,N`-дициклогексилмочевины начинает выпадать в течение 2-3 ч после прибавления карбодиимида. Реакционную смесь перемешивают 48 ч при комнатной температуре, ход реакции контролируют методом ТСХ на пластинках Silufol. 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 1,42 г (84 %), $T_{пл}$ 185-186°С. Состав полученного соединения подтвержден элементным анализом.

Результаты и обсуждение

Существует ряд методов, которые используются для синтеза пептидных соединений. Наиболее простым и широко использующимся для получения пептидов является карбодиимидный способ, в котором используется N,N^1-дициклогексилкарбодиимид (ДЦГК) в качестве дегидратирующего средства при образовании пептидной связи. Схема синтеза амидных производных бетулиновой кислоты представлена на рис. 1.

В результате реакции ДЦГК связывает выделяющуюся в процессе реакции воду и превращается в дициклогексилмочевину (ДЦГМ), которая обладает плохой растворимостью в большинстве используемых в пептидном синтезе растворителей и может быть легко отделена от реакционной массы фильтрованием [12].

Для получения N-пропиламида бетулиновой кислоты (I) использовали соляно-кислый

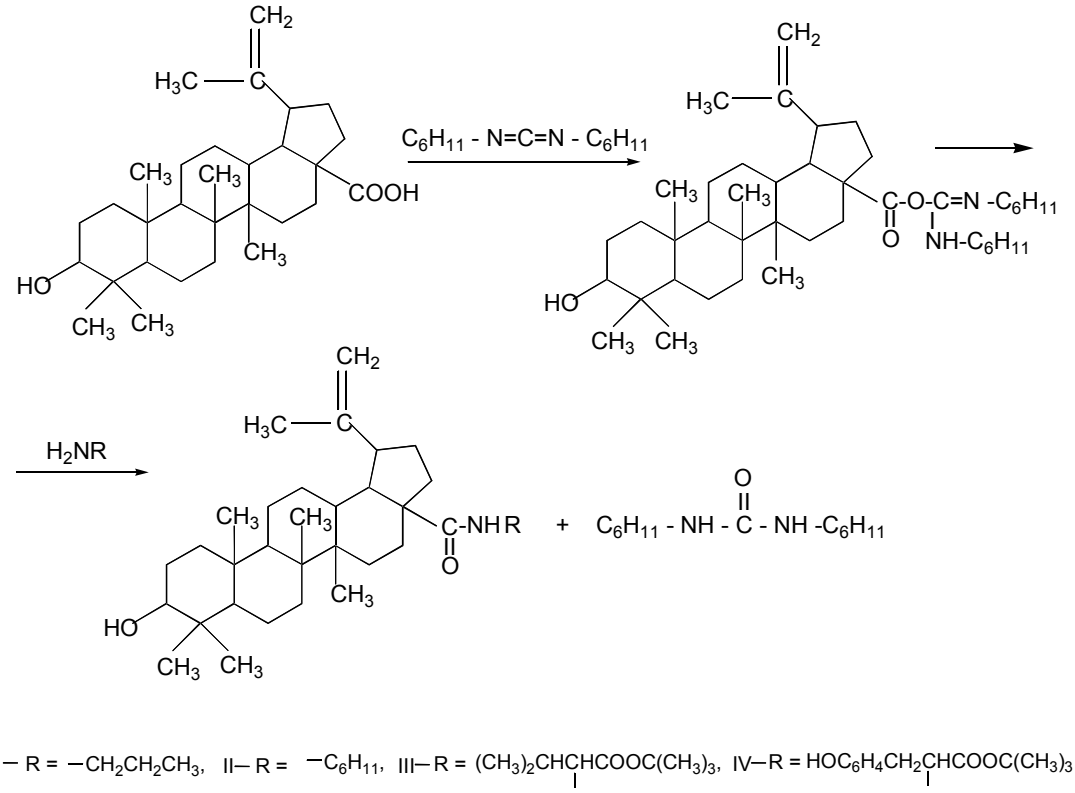

Рис. 1. Схема синтеза амидных производных бетулиновой кислоты

пропиламин, для перевода которого в свободное состояние в реакционную смесь добавляли триэтиламин, реакцию проводили в хлороформе, N,N[1]-дициклогексилкарбодиимид подавали в реакционную массу, охлажденную до температуры минус 5 - 10°С, порциями.

Конденсацию бетулиновой кислоты с циклогексиламином (II) проводили в хлористом метилене. Выпавшую в осадок в процессе реакции N,N[1]-дициклогексилмочевину отделяли фильтрованием, растворитель удаляли под вакуумом.

Структура циклогексиламида бетулиновой кислоты и пропиламида бетулиновой кислоты подтверждена данными ИК-, ЯМР ^{1}H-спектроскопии. В качестве примера на рис. 2 приведен ИК-спектр циклогексиламида бетулиновой кислоты.

Согласно [13], алифатические амиды, содержащие группировку CONHR, имеют полосы ν (N-H) при 3440 см$^{-1}$ – свободная форма и 3300 см$^{-1}$ – ассоциированная форма, полоса амид ν (C=O) при 1680 см$^{-1}$ и 1640 см$^{-1}$ соответственно свободная и ассоциированная формы, и полоса амид δ (N-H) при 1530 см$^{-1}$ и 1260 см$^{-1}$ – свободная форма и 1570 см$^{-1}$ и 1300 см$^{-1}$ ассоциированная форма. Показано, что спектры амидов в твердом состоянии (матричные спектры) очень чувствительны к кристаллической структуре и при наличии связей N-H всегда наблюдается ассоциация. В ИК-спектрах циклогексиламида бетулиновой кислоты и пропиламида бетулиновой кислоты, снятых в матрице KBr, имеются все присущие этому классу соединений характерные полосы при 3452 см$^{-1}$, 3327 см$^{-1}$, полоса (C=O) при 1707 см$^{-1}$ для циклогексиламида бетули-

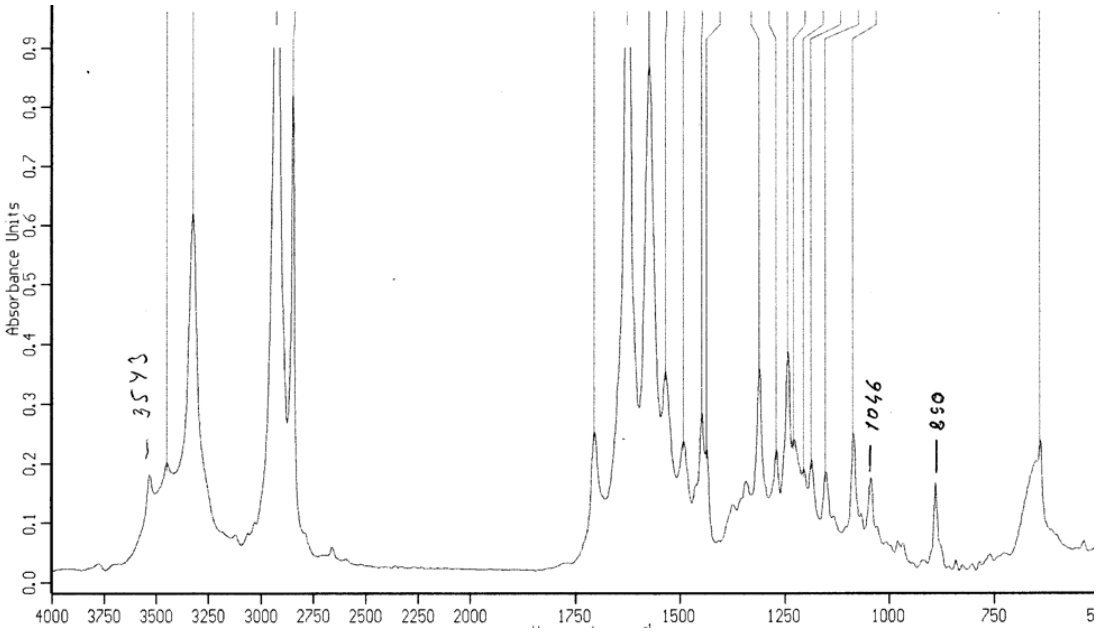

Рис. 2. ИК-спектр циклогексиламида бетулиновой кислоты

новой кислоты и при 1686,8 см$^{-1}$ для пропиламида бетулиновой кислоты, что соответствует карбонильной группе амидов, а также карбонильной группе в амидных производных бетулоновой кислоты, приведенных в работе [6]. В полученных соединениях также имеются полосы δ (N-H) при 1536 см$^{-1}$ и 1271 см$^{-1}$, присущие свободной форме амидов, и 1575 см$^{-1}$, 1312 см$^{-1}$, характерные для ассоциированной формы амидов [13].

Спектры ЯМР H^1 содержат характерные сигналы двух протонов двойной связи изопропенильного радикала при 4,46 и 4,60 м.д. для циклогексиламида бетулиновой кислоты и при 4,47 и 4,61 м.д. для пропиламида бетулиновой кислоты. Это указывает на то, что двойная связь бетулинового фрагмента в процессе реакции остается в неизменном виде. В ЯМР H^1-спектрах полученных соединений также присутствуют сигналы протонов CH_2-групп циклогексиламидного и пропиламидного фрагментов в области 3,00-3,50 м.д. На рис. 3 приведен ЯМР H^1-спектр пропиламида бетулиновой кислоты.

Авторами работы [5] было показано, что аминокислотные производные бетулоновой кислоты обладают высокой анти-ВИЧ-активностью. С целью расширения их ассортимента синтезированы производные бетулиновой кислоты, содержащие у атома С-28 фрагменты аминокислот – валина и тирозина. Чтобы исключить самоконденсацию кислоты, карбоксильные группы защищены превращением в третбутиловые эфиры. Третбутиловые эфиры кислот были получены действием изобутилена на спиртовые растворы аминокислот в присутствии серной кислоты [11].

Синтез амидных производных бетулиновой кислоты, содержащих третбутиловый эфир валина (III) и третбутиловый эфир тирозина (IV), также осуществлен карбодиимидным методом в хлористом метилене при температуре от 5 до 15°С. Основные характеристики полученных соединений приведены в таблице.

В ИК-спектрах синтезированных производных бетулиновой кислоты с третбутиловым эфиром валина (III) и третбутиловым эфиром тирозина (IV) наблюдаются полосы

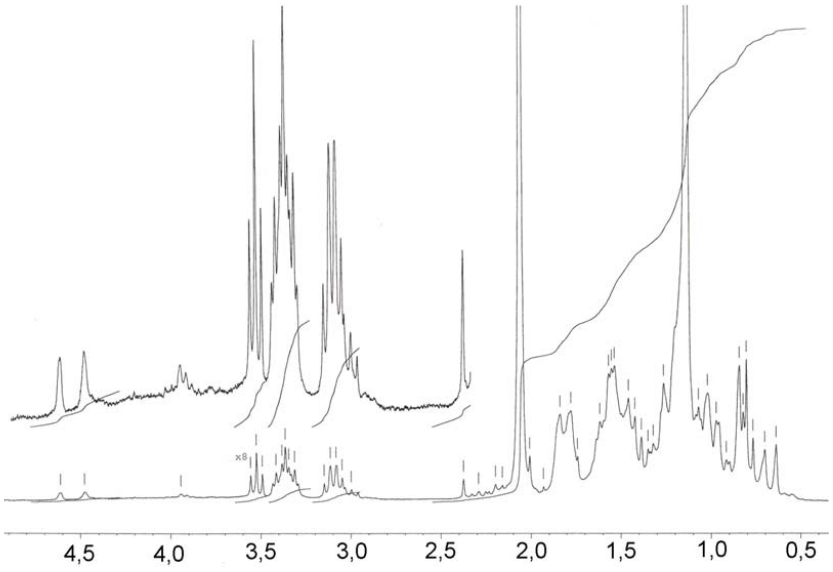

Рис. 3. ЯМР H^1-спектр пропиламида бетулиновой кислоты

Таблица. Амидные производные бетулиновой кислоты

Соединение	$T_{пл}$, °C	Найдено		Брутто-формула	Вычислено, %		Выход, %
		N	C		N	C	
I	193-194	2,71 2,87	79,39 79,57	$C_{33}H_{56}O_2N$	2,81	79,52	84
II	218-219	2,78 2,51	80,31 80,56	$C_{36}H_{59}O_2N$	2,61	80,45	89
III	197-198	2,21 2,38	76,93 76,75	$C_{39}H_{65}O_4N$	2,90	76,25	83
IV	185-186	2,11 2,04	76,38 76,52	$C_{43}H_{65}O_5N$	2,07	76,44	84

валентных колебаний C=O связи амидной и сложноэфирной или карбоксильной групп в области соответственно 1671-1686, 1746-1748 и 1706 $см^{-1}$, гидроксигруппа при C-3 3330-3530 $см^{-1}$. На рис. 4 приведен ИК-спектр производного бетулиновой кислоты с третбутиловым эфиром валина.

Спектры ЯМР H^1 помимо характеристических сигналов двух протонов концевой двойной связи тритерпеноидного скелета при 4,614 м.д. и 4,752 м.д. содержат характеристические сигналы протонов 0,847 м.д. (3H, Me-24), 0,939-0,941 м.д. (3H, Me-26), 0,959 м.д. (6H, Me-23,27), 1,653-1,658 м.д. (3H, Me-30), 2,202-2,205 м.д. (2H, $CH_2COOCCH_3$), 3,041-3,256 м.д. (2H, $CONHCH_2$). Помимо перечисленных в ЯМР ^1H-спектре производного с тирозином присутствуют сигналы ароматических протонов при 6,8-7,0 м.д. На рис. 5 приведен ЯМР H^1-спектр производного бетулиновой кислоты с третбутиловым эфиром тирозина.

Отнесение сигналов протонов полученных соединений сделано с использованием данных ЯМР H^1 для аминокислотных производных бетулоновой кислоты [5,6].

Вывод

Синтезированы амидные производные бетулиновой кислоты с алифатическими аминами, пропиламином и циклогексиламином, и

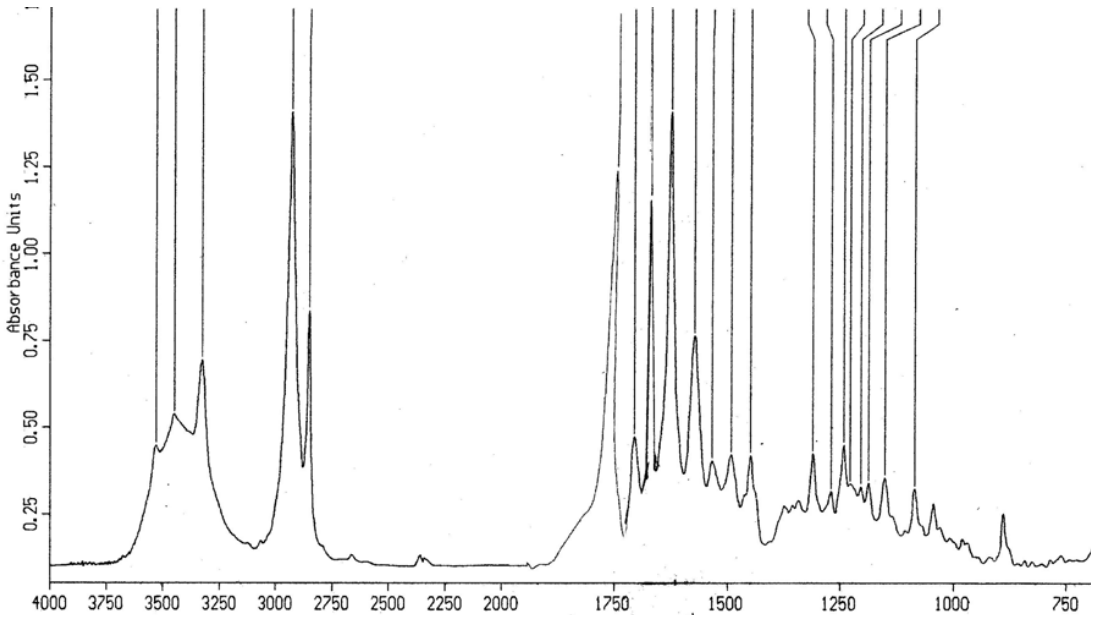

Рис. 4. ИК-спектр производного бетулиновой кислоты с третбутиловым эфиром валина

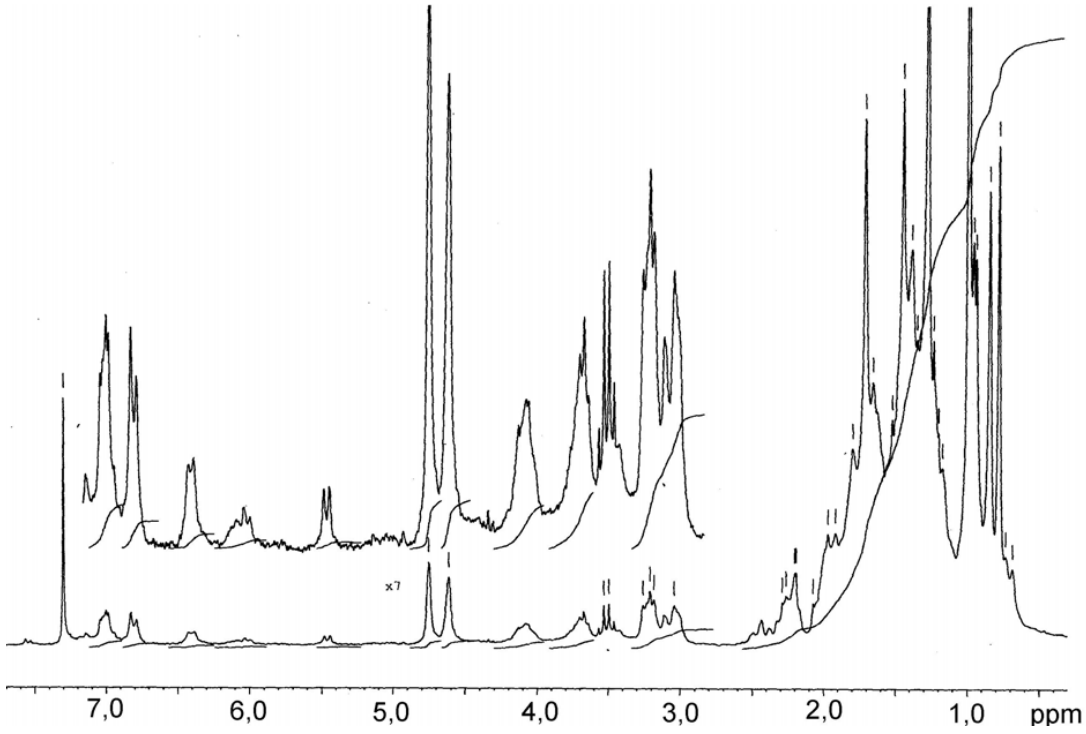

Рис. 5. ЯМР ^{1}H-спектр производного бетулиновой кислоты с третбутиловым эфиром тирозина

третбутиловыми эфирами аминокислот – валином и тирозином. Показана перспективность использования карбодиимидного метода при синтезе амидов бетулиновой кислоты.

Список литература

[1] Fulda S., Friesen C., Los M.. Scaffidi C., Mier W., Benedict M., Nunez G., Krammer P.H., Peter M.E., Debatin K.M. J Cancer Res. 1997; V.57. P.4956-4964.

[2] Самошина Н.Ф., Денисенко М.В., Денисенко В.А, Уварова Н.И. Синтез гликозидов тритерпеновых кислот лупанового ряда. Химия природных соединений. 2003. №6. С 475-481.

[3] 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 аллоббетулина. Химико-фармацевтический журнал. 2005. Т.39. №8. С. 9-12.

[4] Сымон А.В., Веселова Н.Н., Каплун А.Н., Власенкова Н.К., Фёдорова Г.А., Лютик А.И., Герасимова Г.К., Швец В.И. Синтез циклопропановых производных бетулиновой и бетулоновой кислот и их противоопухолевая активность. Биоорганическая химия. 2005. Т.31. №3. С320-325.

[5] Покровский А.Г., Плясунова О.А., Ильичева Т.Н., Борисова О.А., Федюк Н.В., Петренко Н.И., Петухова В.З., Шульц Э.Э., Толстиков Г.А. Синтез производных растительных тритерпенов и исследование их противовирусной и иммуностимулирующей активности. Химия в интересах устойчивого развития. 2001. Т.9. №3. С. 485-491.

[6] Петренко Н.И., Еланцева Н.В., Петухова В.З., Шакиров М.М., Шульц Э.Э., Толстиков Г.А. Синтез производных бетулоновой кислоты, содержащих аминокислотные фрагменты Химия природных соединений. 2002. №4. С. 276-283.

[7] 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.

[8] Кузнецов Б.Н., Левданский В.А., Шилкина Т.А., Репях С.М. Способ получения бетулина. Патент РФ №2074867, 1997.

[9] Шон Ле Банг, Каплун А.П., Шпилевский А.А., Андия-Правдивый Ю.Э., Алексеева С.Г., Григорьев В.Б., Швец В.И. Синтез бетулиновой кислоты из бетулина и исследование её солюбилизации с помощью липосом. Биоорганическая химия. 1998. Т.24. №10. С.787-793.

[10] Darrick S.H.L. Kim, Zhidong Chem, Van Tuyen Nguen, John M. Pezzuto, Shengxiang Qiu, Zhi-Zhen Lu. A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin. Synthetic communication.- 1997. V. 27, N 9.- P. 1607-1612.

[11] Вейганд-Хильгетаг. Методы эксперимента в органической химии. Пер. с нем. Л.В. Коваленко и А.А. Заликина / Под ред. проф. Н.Н. Суворова. М.: Химия, 1968. 944 с.

[12] Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов / Под. ред. М.М.Шемякина. М.: Мир, 1965. 824 с.

[13] Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976. 541 с.

Compound Products of Betulinic Acid Condensation with the Aliphatic Amines and Aminoacids

Vladimir A. Levdansky
Siberian Federal University,
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia

Amide compounds of betulinic acid with aliphatic amine, propylamin and cyclohexylamine and tretbutil ether aminoacid – valin and tyrosine were syntesized with the use of carbodiimide method.

Keywords: carbodiimide method, betulinic acid, propylamin, cyclohexylamine, valin, tyrosine.