

УДК 547.902.659.4

Улучшенный двухстадийный метод получения бетулиновой кислоты из бетулина

Тамара И. Когай*

Сибирский федеральный университет,
пр. Свободный 79, Красноярск, 660041, Россия¹

Received 15.01.2008, received in revised form 15.03.2008, accepted 10.04.2008

Предложен усовершенствованный двухстадийный способ получения бетулиновой кислоты из бетулина.

На первой стадии очищенный бетулин окисляли реактивом Джонса в ацетоне при 0°С. Найдено соотношение реагентов бетулин – триоксид хрома, при котором бетулин окисляется в течение 0,5 часа с выходом 55 %.

На второй стадии получена бетулиновая кислота путём восстановления бетулоновой кислоты боргидридом натрия в двухфазной системе вода – органический растворитель в присутствии четвертичных солей аммония при комнатной температуре. Найдены оптимальные соотношения бетулоновая кислота – боргидрид натрия – четвертичная соль аммония. Наиболее эффективные переносчики боргидрид – иона из водной фазы в органическую и подходящие органические растворители обеспечивают выход бетулиновой кислоты 98,5 – 99,3 %.

Ключевые слова: бетулиновая кислота, бетулоновая кислота, бетулин, окисление, реактив Джонса, катализаторы межфазного переноса, боргидрид натрия, восстановление.

Использование природных соединений в качестве объектов химических трансформаций с целью получения биологически активных агентов стало одним из активно развивающихся направлений органического синтеза. Лекарственные препараты, полученные путём химической модификации природных соединений, обладают рядом преимуществ по сравнению с синтетическими аналогами. Они малотоксичные, обеспечивают многостороннее действие на организм, редко вызывают побочные явления.

Особенно ценно то, что многие перспективные объекты химических трансформаций можно получать практически в неограни-

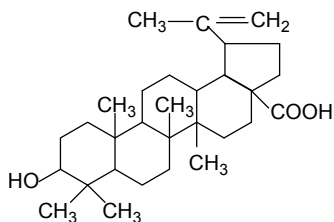
ченном количестве из отходов лесной и деревоперерабатывающей промышленности. Очень ценным отходом является кора берёзы. Во внешней части коры берёзы — бересте — найден бетулин, содержание которого достигает 30 - 40 % [1]. Бетулин легко и почти полностью экстрагируется из бересты такими дешёвыми экстрагентами, как алифатические углеводороды, спирты C₁ – C₄, ацетон [2], и, следовательно, считается легко доступным исходным сырьём.

Бетулин и соединения, полученные путём его химических трансформаций, проявляют биологическую активность широкого спектра действия.

* Corresponding author E-mail address: kogay@lan.krasu.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

Так бетулиновая (3 β -гидрокси-20(29)-лупаен-28-овая) кислота и её производные обладают противовоспалительной, противоопухолевой и анти-ВИЧ- активностью [3,4]:



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 и получить биологически активный 3 β -изомер [5,6]. Сущность этих методов заключается в защите гидроксильных групп бетулина, снятии защиты у первичной гидроксильной группы, окислении первичной гидроксильной группы в карбоксильную, снятии защиты у вторичной гидроксильной группы. Был разработан пятистадийный способ получения бетулиновой кислоты из бетулина [5], по которому на первой стадии проводят защиту первичной гидроксильной группы дигидропираном с образованием тетрагидропиранового эфира бетулина. Затем проводят защиту вторичной гидроксильной группы ацилированием уксусным ангидридом в пиридине с последующим снятием тетрагидропирановой защиты. Далее осуществляют окисление моноацетата бетулина реактивом Джонса в моноацетат бетулиновой кислоты с последующим получением бетулиновой кислоты отщеплением ацетильной группы карбонатом калия в метаноле. Этот метод даёт возможность получать 3 β -изомер бетулиновой кислоты, обладающий, в отличие от 3 α -изомера, биологической активностью. К недостаткам этого

метода можно отнести его многостадийность, а, следовательно, длительность процесса в целом и небольшой суммарный выход целевого продукта (40 – 50 %).

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 3 α -гидрокси-20(29)-лупаен-28-овую кислоту (3 α -изомер) [7,8]. Преимущества этой группы методов связаны не только с сокращением числа стадий процесса, но и с увеличением выхода целевого продукта, даже с учётом снижения выхода 3 β -изомера вследствие появления 3 α -изомера.

В двухстадийных схемах получения бетулиновой кислоты бетулин вначале окисляют в бетулоновую кислоту, которую затем восстанавливают изопропилатом алюминия или комплексными гидридами в бетулиновую кислоту [7,8].

Для превращения бетулина в бетулоновую кислоту было предложено использовать несколько окислителей: азотную кислоту, перманганат калия в присутствии дибензо-18-краун-6, 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 [9]. Восстановленная соль хрома часто осаждается, ацетоновый раствор отделяется декантацией, что облегчает обработку и выделение полученного продукта. Окисление бетулина реактивом Джонса сопровождается рядом побочных реакций [10]. 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).

В качестве восстановителя при превращении бетулоновой кислоты в бетулиновую в основном используют боргидрид натрия. Восстановление бетулоновой кислоты боргидридом натрия осуществляют в спиртах $C_1 - C_3$ или тетрагидрофуране. Бетулоновая кислота ограниченно растворима в этих растворителях, а так как и боргидрид натрия плохо растворим в спиртах и совсем не растворим в тетрагидрофуране, то практически восстановление протекает в гетерогенной среде, поэтому скорость восстановления невелика. Попытки найти такой растворитель, в котором достаточно хорошо растворяются и бетулоновая кислота, и боргидрид натрия, не увенчались успехом, так как они обладают диаметрально противоположным свойством растворимости. Поэтому для уменьшения времени проведения процесса восстановления и увеличения выхода бетулиновой кислоты используют четырехшестикратный избыток боргидрида натрия [7, 11], но и при таких приёмах проведения синтеза время восстановления бетулоновой кислоты в спиртах составляет 4 часа, в воде – 6 часов, а в тетрагидрофуране – 12 часов. При выделении восстановленного продукта избыток боргидрида натрия разлагают минеральной кислотой, следовательно, боргидрид натрия безвозвратно теряется. Если учесть относительно высокую стоимость этого восстановителя, то становится понятным необходимость поиска более экономичных способов прове-

дения процесса восстановления бетулоновой кислоты.

Цель данной работы заключалась в поиске таких условий окисления бетулина оксидом хрома (VI) и последующего восстановления образующейся бетулоновой кислоты, которые бы позволили увеличить выход бетулоновой и бетулиновой кислот, свести к минимуму количество восстановителя, сократить общее время двухстадийного процесса.

Экспериментальная часть

Контроль хода реакции осуществляли методом ТСХ на пластинках «Silyfol» с использованием растворителей хлороформ – метанол – муравьиная кислота в соотношении 100:2:0,5. ИК-спектры записывали на приборе «Vektor»-22 в KBr, спектры ПМР – на приборе «Avance 200» (BRUKER) с рабочей частотой 200 МГц в $CDCl_3$.

Синтез бетулоновой кислоты

В трёхгорлую колбу, вместимостью 500 мл, снабжённую мешалкой, загружали 5,0 г бетулина и 200 мл очищенного ацетона. Реакционную смесь охлаждали до $0^\circ C$ и при перемешивании добавляли по каплям рассчитанное количество оксида хрома (VI) в виде стандартного реактива Джонса в ацетоне [12]. По окончании реакции в колбу добавляли 50 мл этанола, перемешивание продолжали ещё 5 – 10 минут. Затем реакционную смесь выливали в 500 мл смеси воды и льда, в которую предварительно добавляли 50 мл разбавленной соляной кислоты 1:2. Осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтральной реакции. Неочищенную бетулоновую кислоту растворяли в 200 мл диэтилового эфира, органический слой промывали два раза разбавленной соляной кислотой, водой, 5 % раствором бикарбоната натрия и снова водой до нейтральной реакции.

Для дальнейшей очистки в эфирный раствор бетулоновой кислоты добавляли 6 мл 2н раствора гидроксида натрия. Эфир отгоняли, осадок натриевой соли бетулоновой кислоты промывали сначала водой, затем, 10 % раствором хлорида натрия, затем диэтиловым эфиром. Для выделения бетулоновой кислоты её натриевую соль обрабатывали кислотой и водой. Бетулоновую кислоту растворяли в диэтиловом эфире, промывали водой, органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия. Эфирный слой отгоняли. Выделили аналитически чистую бетулоновую кислоту, т.пл. 250 – 252°C.

Восстановление бетулоновой кислоты

В колбу вместимостью 50 мл, снабжённую эффективной мешалкой, вводили 0,25 г (0,55 ммоль) бетулоновой кислоты, 10 мл органического растворителя, приливали раствор боргидрида натрия в воде, затем вводили катализатор межфазного переноса. На 1 ммоль восстановителя использовали 0,5 ммоль катализатора межфазного переноса. Во всех опытах восстановление проводили в течение 2-х часов при комнатной температуре при интенсивном перемешивании. По окончании реакции в колбу добавляли 10 мл 5 % раствора соляной кислоты для разложения остатков боргидрида натрия. После окончания разложения продукт реакции экстрагировали диэтиловым эфиром. Эфирный экстракт промывали водой, содой,

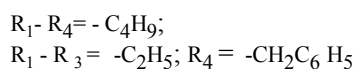
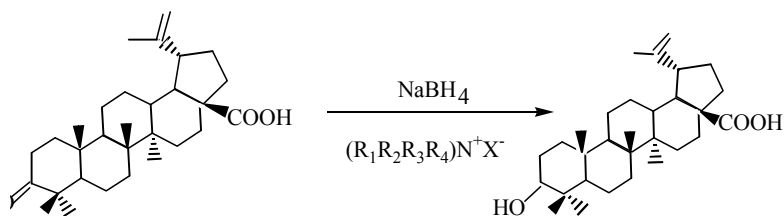
затем снова водой, сушили над сульфатом натрия. Эфир отгоняли. Остаток после отгонки эфира анализировали методами ИК- и ПМР-спектроскопии.

Результаты и обсуждение

Предварительные опыты показали, 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. Данные по зависимости выхода бетулоновой кислоты от времени окисления представлены в табл. 1.

При увеличении количества оксида хрома (VI) от 1 до 7 молей на 1 моль бетулина выход бетулоновой кислоты увеличивается от 17,5 до 55,0 %, причём время окисления уменьшается от 4-х до 0,5 часа.

Для восстановления бетулоновой кислоты в бетулиновую был применён метод межфазного катализа.



В качестве органической фазы использованы такие растворители, как дихлорметан, 1,2-дихлорэтан, бензол, толуол. В качестве катализаторов межфазного переноса (КМФП) были исследованы триэтилбензиламмоний хлорид (ТЭБАХ), тетрабутиламмоний бромид (ТБАБ), тетрабутиламмоний иодид (ТБАИ) и N-1-адамантилпиридиний бромид.

Варьировалось мольное соотношение бетулоновой кислоты и боргидрида натрия, концентрация боргидрида натрия в водной фазе, количество катализатора межфазного переноса. В системе органический растворитель – вода бетулоновая кислота находилась в органической фазе, а боргидрид натрия – в водной фазе.

Процент непрореагировавшей бетулоновой кислоты определяли, анализируя ИК-спектры продуктов реакции, методом “базовой линии” [13]. Для количественных измерений была выбрана полоса поглощения при 1705 см⁻¹, соответствующая валентным колебаниям кетогруппы бетулоновой кислоты. В ИК-спектрах серии проб с концентрациями бетулоновой кислоты от 2 до 5 мг и шагом 0,5 мг

измеряли пропускание (%) у базовой линии и пропускание (%) в минимуме полосы. Из этих данных рассчитывали поглощение полосы при 1705 см⁻¹, строили калибровочный график (зависимости поглощения от концентрации бетулоновой кислоты) для определения количества бетулоновой кислоты в рабочих образцах.

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать следующие выводы. Для восстановления бетулоновой кислоты боргидридом натрия наиболее эффективными межфазными катализаторами оказались ТЭБАХ и ТБАБ (табл. 2). При их использовании восстановление протекает за 2 часа на 98,5 – 99,3 %. В ИК-спектрах этих образцов отсутствует полоса поглощения при 1705 см⁻¹. Анализ ПМР спектров подтверждает, что продукт реакции – это практически чистая бетулиновая кислота. В спектре ПМР (δ, м.д.) появляется протон при С3: 3,44 (трипл. 1Н, 3Н α-гидрокси- изомер) 3,22 (дубл.дубл. 1Н, 3Н β-гидрокси- изомер).

N-1-адамантилпиридиний бромид менее эффективный катализатор межфазного переноса, чем ТЭБАХ и ТБАБ. Так, в системе бензол

Таблица 1. Зависимость выхода бетулоновой кислоты от времени окисления бетулина реактивом Джонса (соотношение бетулин: CrO₃ – 1: 3)

Время, ч	Выход бетулоновой кислоты, %	Время, ч	Выход бетулоновой кислоты, %
1	15,4	5	37,3
2	26,3	6	23,8
3	42,5	7	9,2
4	54,5		

Таблица 2. Степень превращения бетулоновой кислоты в различных растворителях в условиях межфазного катализа

Катализатор межфазного переноса	Степень превращения бетулоновой кислоты в различных растворителях, %			
	бензол	1,2-дихлорэтан	дихлорметан	толуол
ТЭБАХ	98,5	75,3	68,1	74,6
ТБАБ	99,3	78,3	69,2	77,4
N-1-адамантилпиридиний бромид	59,4	48,3	-	-

– вода за 2 часа бетулоновая кислота восстановилась только на 59,4 %. Тетрабутиламмоний иодид в хлорсодержащих органических растворителях большей частью переходит в органическую фазу без обмена иодид-иона на боргидрид-ион (в органической фазе обнаружено присутствие иодид-ионов).

Проведённые исследования показали, что степень конверсии бетулоновой кислоты зависит от природы органического растворителя. Наилучшие результаты были получены при использовании бензола в качестве органической фазы. В системах бензол – вода – ТЭБАХ и бензол – вода – ТБАБ достигалось практически полное восстановление бетулоновой кислоты. В толуоле за два часа восстановилось только 77,4 % бетулоновой кислоты при использовании в качестве катализатора ТБАБ.

В хлорсодержащих органических растворителях, дихлорметане и 1,2-дихлорэтане, реакция восстановления протекает с меньшей скоростью в присутствии всех изученных катализаторов. В дихлорметане степень превращения бетулоновой кислоты составила 69,2 %, а в 1,2-дихлорэтане – 78,3 % (катализатор ТБАБ) за 2 часа.

Следует отметить, что в данном случае для достижения высокой эффективности процесса восстановления требуется использование большего, чем принято в практике межфазного катализа [9], количества катализатора. Оптимальное мольное соотношение восстановитель – катализатор составило 4 : 1. При меньших значениях мольных соотношений восстановитель – катализатор эффективность восстановления падает.

Концентрация боргидрида натрия в водной фазе существенно влияет на скорость восстановления. При концентрации боргидрида натрия, равной 1,5 %, бетулоновая кислота восстанавливается за 2 часа в системах бензол

– вода – ТЭБАХ и бензол – вода – ТБАБ на 98,5 – 99,3 %. При меньших концентрациях боргидрида натрия в водной фазе скорость восстановления уменьшается. При концентрации боргидрида натрия 0,5 % бетулоновая кислота восстанавливается за 2 часа на 41,7 % в системе бензол – вода – ТБАБ.

Применение межфазных катализаторов в реакции восстановления бетулоновой кислоты в бетулиновую кислоту позволило снизить расход боргидрида натрия до 2 - х молей на 1 моль бетулоновой кислоты, сократить время процесса до 2 - х часов и получить практически чистую бетулиновую кислоту.

Заключение

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

Изучен процесс восстановления бетулоновой кислоты в бетулиновую кислоту в условиях межфазного катализа. 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 суммарным выходом 54,6 %.

Список литературы

- [1] Толстикова Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстикова А.Г. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность. Химия в интересах устойчивого развития. 2005. № 13. С.2-4.
- [2] Кислицын А.Н. Экстрактивные вещества бересты. Выделение, состав, применение. Химия древесины. 1994. №3. С. 3-28.
- [3] Pisha E. Method for selectivity inhibiting melanoma, using betulinic acid. Nat. Med. 1995. Vol.1. P. 1046-1051.
- [4] Fujioka T. Compounds and methods of use to treat HIV infections. J. Nat. Prod. 1994. Vol. 57. P. 243 – 247.
- [5] Pezzuto Dg., Darrick S.H.L. Kim. Methods of manufacturing betulinic acid. US patent 5.804.575.1997.
- [6] Ruzicka L., Lamberton A.H., Christie Ruzicka C.W. Synthetic approach to betulinic acid. Helv. Chim. Acta. 1938. Vol.21. P. 1706-1717.
- [7] Darrick S. H. L. Kim, Zhidong Chen, Tuyen Nguen van. A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin. Synth Commun. 1997. Vol. 27. N 9. P. 1607-1612.
- [8] Шон Ле Банг, Каплун А.П. Синтез бетулиновой кислоты из бетулина и исследование его солюбилизации с помощью липосом. Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. № 10. С. 787-793.
- [9] Флехтер О.Б., Нигматулина Л.Р., Балтина Л.А. Получение бетулиновой кислоты из экстракта бетулина. Химико-фармацевтический журнал. 2002. Т.36. С.26-28.
- [10] Wiberg K.B. Oxidation in organic Chemistry. New York. NY.: Academic Press, 1965. – P. 69-72.
- [11] Когай Т.И., Кузнецов Б.Н. Способ получения бетулиновой кислоты из бетулоновой кислоты. Патент РФ 2271364. 2006.
- [12] Физер Л., Физер М. Реагенты для органического синтеза. М.: Мир, 1971. Т. IV. С. 176.
- [13] Петерс Д., Хайес Дж., Хифтье Г. Химическое разделение и измерение. М.: Химия, 1978. С. 737-739.

Improved Two-stage Method of Manufacturing Betulinic Acid from Betulin

Tamara I. Kogay
Siberian Federal University,
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia

The article concerns an improved two-stage method of manufacturing betulinic acid from betulin. First the purified betulin was oxidized by chromium trioxide in acetone (Jones' reagent) at 0°C. The complete reaction was carried out in half an hour yielding 55 % of betulonic acid when the betulin : chromium trioxide molar ratio was 1 : 7.

Then the betulonic acid was reduced with sodium borohydride in two-phase catalytic system using quaternary alkyl ammonium salts as a catalyst at the ambient temperature. The optimal reaction conditions (the betulonic acid – sodium borohydride – quaternary ammonium salt ratio) as well as the best organic phase to provide 98.5 – 99.3 % betulinic acid yield were found

Key words: betulinic acid, betulonic acid, betulin, oxidation, Jones' reagent, phase transfer catalysts, sodium borohydride, reduction.
