

На правах рукописи



003463486

Михайлова Лилия Рафаиловна

**ВЫДЕЛЕНИЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ
НЕКОТОРЫХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ СОЛОДКИ УРАЛЬСКОЙ**

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

12 МАР 2009

Уфа-2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте органической химии Уфимского научного центра Российской академии наук

Научный руководитель: доктор химических наук,
профессор
Балтина Л.А.

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор
Зорин В.В.

кандидат химических наук,
доцент
Боцман Л.П.

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Башкирский государственный университет»

Защита диссертации состоится 20 марта 2009 г. в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 002.004.01 в УРАН Институте органической химии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, Башкортостан, г. Уфа, проспект Октября, 71, факс (347) 2356066; e-mail: chemorg@anrb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке УРАН УНЦ РАН.

Автореферат разослан 17 февраля 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор химических наук,
профессор



Валеев Ф.А.

Актуальность темы. Неослабевающий интерес химиков-синтетиков и биологов к основным тритерпеновым веществам корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и уральской (*Gl. uralensis* Fisher) – глицирризиновой кислоте (ГК) и ее основному метаболиту – глицирретовой кислоте (ГЛК) связан, прежде всего, с высокой и разнообразной биологической и фармакологической активностью этих природных соединений (противовоспалительной, противоязвенной, гепатопротекторной, антиоксидантной, противовирусной, противоопухолевой и др.) и легкостью выделения из растительного сырья. ГК и ГЛК являются ярким примером перспективности направленных химических трансформаций тритерпеноидов в интересах медицинской химии. Таким образом, проведение исследований в области поиска новых растительных источников для получения тритерпеноидов солодки и проведение их направленных синтетических трансформаций с целью получения новых биологически активных веществ для медицины является актуальной задачей.

В настоящей работе в качестве базовых структур для синтетических трансформаций были использованы ряд тритерпеновых кислот солодки уральской и их производные, в качестве растительного сырья - корни *Glycyrrhiza uralensis* Fisher сибирских популяций.

Цель работы. Исследование тритерпеноидного состава экстракта корней солодки уральской сибирских популяций; синтез новых производных и аналогов тритерпеноидов с измененным пентациклическим скелетом молекул.

Работа выполнена в соответствии с планами научно-исследовательских работ Института органической химии Уфимского научного центра РАН по теме: «Химические трансформации и синтез аналогов биологически активных терпеноидов» (регистрационный номер 0120.0500681), при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) и БНТСа Австрии (международный грант 03-03-20004); РФФИ (грант 08-03-00366); грантов Президента РФ № НШ-1488.2003.3 на поддержку молодых российских ученых и ведущих научных школ; № 02.120.11.1589 для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-1589.2006.3); Федерального агентства по науке и инновациям (Роснаука) по темам 2005-РИ-12.0/004/088 «Синтез и изучение противовирусной активности новых производных и аналогов глицирризиновой кислоты и родственных соединений» (международный проект № 01.2006 12303); 2005-РИ-112/001/375 «Исследование реакционной способности низкомолекулярных растительных метаболитов – научная основа разработки лекарственных препаратов высокой социальной значимости» (научные школы) в рамках федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» на 2002-2006 гг.

Научная новизна и практическая значимость. Исследован тритерпеновый состав экстракта корней солодки уральской сибирских популяций и проведены окислительные и скелетные превращения 11-дезоксо-ГЛК, ее производных и родственных тритерпеноидов.

Предложены удобные методы синтеза новых производных 11-дезоксо-ГЛК, содержащих дополнительные кислородсодержащие (оксо, эпокси) функциональные группы с использованием в качестве окислителей озона, мета-хлорнадбензойной кислоты и диметилдиоксирана.

Осуществлен синтез новых А(С)-гомо-А(С)-аза-производных и 3-циано-3,4-секо-олеан-4-енов 11-дезоксо-ГЛК и олеан-9,12-диен-30-овой кислоты.

Проведены скелетные и окислительные превращения 11-дезоксо-ГЛК по кольцу А с получением 4,23,24-нортритерпеновых производных с циклоприсоединением циклов А и В.

Методами ЯМР спектроскопии высокого разрешения ^1H (400 МГц) и ^{13}C (125 МГц) впервые сделано полное отнесение сигналов протонов и атомов углерода в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C А-нор-производных.

Предложен простой метод получения тритерпеновых 1,2-транс-гликозидов путем гликозирования тритерпеноидов пер-О-ацетатами моносахаридов при активации SnCl_4 .

Среди новых тритерпеновых производных выявлены вещества, обладающие гепатопротекторной, противоязвенной и анти-ВИЧ-1 активностью.

Апробация работы. Результаты исследований доложены на VI Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2002 г.); 5-й Международном симпозиуме по химии природных соединений (Ташкент, 2003); 4-м Всероссийском симпозиуме по органической химии (Москва, 2003); IV Всероссийском научном семинаре и Молодежной научной школе «Химия и медицина» (Уфа, 2003); 13-м Европейском симпозиуме по органической химии (Дубровник, Хорватия, 2003 г.); III Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ» (Саратов, 2004 г.); 2-ой Международной конференции по природным соединениям и физиологически активным веществам (Новосибирск, 2004 г.); VIII молодежной научной школе-конференции по органической химии (Казань, 2005 г.); Международном симпозиуме по химии, биологии и медицине (Пафос, Кипр, 2006 г.); IV Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар, 2006 г.); XIX Международном симпозиуме по медицинской химии (Стамбул, Турция, 2006 г.); XI Молодежной конференции по органической химии, посвященной 110-летию со дня рождения И.Я.Постовского (Екатеринбург, 2008 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 2 статьи в журнале, рекомендованном ВАК, краткое сообщение в международном журнале, тезисы 12 докладов на международных, всероссийских и молодежных конференциях и симпозиумах.

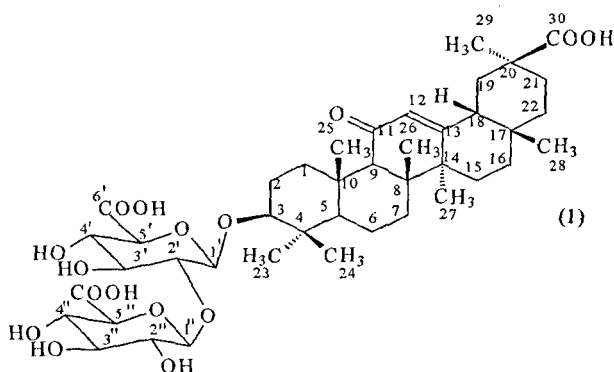
Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 152 стр. и состоит из введения, обзора литературы, трех глав экспериментальных исследований, выводов, списка литературы, включающего 208 наименований, содержит 10 таблиц и 5 рисунков. В приложение включены спектры ЯМР ^1H и ^{13}C , масс-спектры, акты испытаний биологической и фармакологической активности.

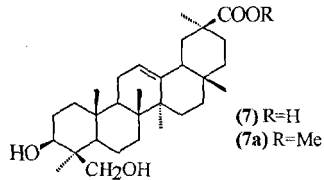
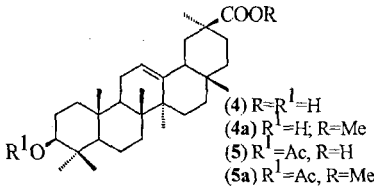
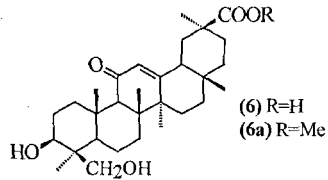
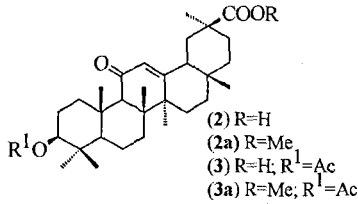
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выделение тритерпеноидов из экстракта корней солодки уральской сибирских популяций

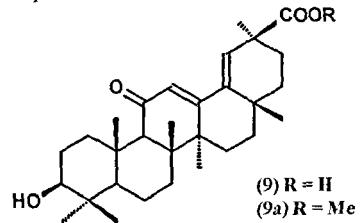
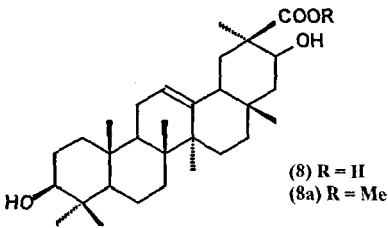
Солодка (с.) уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) – ценное лекарственное растение семейства бобовых (Leguminosae), относящееся к секции настоящих солодок *Euglycyrrhiza* Boiss, которое разрешено к применению в отечественной официальной медицине наряду с с. голой (*Gl. glabra* L.). Лекарственная ценность солодкового корня определяется наличием биологически активных веществ, основным из которых является тритерпеновый гликозид – глицирризиновая кислота (ГК) (1) и ее агликон – $18\beta\text{H}$ -ГЛК (2), относящаяся к олеаненовым тритерпеноидам группы β -амирина.

В качестве растительного сырья использованы корни с. уральской, собранной в Новосибирской области, с содержанием ГК $4,0 \pm 0,8\%$. Для выделения тритерпеновой фракции измельченные корни экстрагировали 2,0% водным раствором NH_4OH , осаждали сумму кислот концентрированной H_2SO_4 (рН 1-2) и гидролизовали 5% $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$.





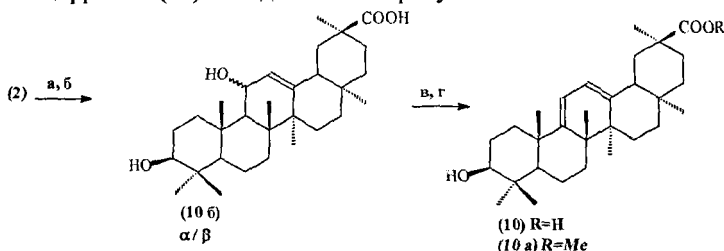
Образующийся осадок рекстрагировали CCl_4 и хроматографировали многократно на колонке с Al_2O_3 . В результате этих операций получены метиловые эфиры 18 β -ГЛК (2a) (4,1%), 11-дезоксо-ГЛК (4a) (0,4%), 24-окси-ГЛК (6a) (0,35%), 24-окси-11-дезоксо-ГЛК (7a) (0,6%) и 21,24-диокси-11-дезоксо-ГЛК (8a) (0,7%). Тритерпеноиды (7a и 8a) были выделены из корней с. уральской российского происхождения впервые.



2. Синтетические трансформации тритерпеноидов

Структурное сходство ГЛК и карбеноксолона со структурой кортикостероидов при длительном применении препаратов ГЛК вызывает ряд побочных эффектов, сходных с избытком в организме гормонов надпочечников (гипокалиемия, задержка натрия в организме, отеки, повышение артериального давления и др.), что связано со способностью ГЛК ингибировать 11 β -гидрокси-стероиддегидрогеназу. Поэтому более привлекательными в качестве темплатных структур для получения новых биологически активных веществ для медицины являются 11-дезоксо-ГЛК (4) и ее производные. Синтетические трансформации данной группы тритерпеноидов, связанные с глубокими структурными преобразованиями и окислительными превращениями, ранее практически не проводились.

В качестве исходных тритерпеноидов были использованы 18 β -ГЛК (**2**), 11-дезоксо-ГЛК (**4**), 18,19-дегидро-ГЛК (**9**) и олеан-9,12-диен-30-овая кислота (**10**) и их производные (**2а**, **3**, **3а**, **4а**, **5**, **5а**, **9а**, **10а**). 11-Дезоксо-ГЛК (**4**) и ее метиловый эфир (**4а**) получены восстановлением ГЛК или метилглицирретата (**2а**) Zn в диоксане в присутствии соляной кислоты.



Условия: а) $\text{NaBH}_4/\text{TГФ-H}_2\text{O}$ (1:1), NaOH ; б) Na_2HPO_4 ; в) HCl/TГФ ; г) $\text{CH}_2\text{N}_2/\text{MeOH/Et}_2\text{O}$

Восстановлением 18 β -ГЛК (**2**) избытком NaBH_4 в смеси ТГФ-вода (1:1) в присутствии NaOH при кипячении получена эпимерная смесь (α/β) 11-окси-производного (**10б**), которая при обработке концентрированной соляной кислотой дегидратируется до 3 β -гидрокси-9(11),12-диена (**10**) (выход 67%). При метилировании диазометаном образуется 30-метиловый эфир (**10а**) с количественным выходом (90%). Метиловый эфир гомоаннулярного диена (**10а**) был получен также при обработке кислоты (**10**) CH_3I в ДМСО в присутствии порошка KOH (выход 78%).

2.1. Окислительные превращения тритерпеноидов

Окислительные превращения биоактивных растительных тритерпеноидов представляют значительный интерес для получения новых кислородсодержащих производных и изучения зависимости структура-активность.

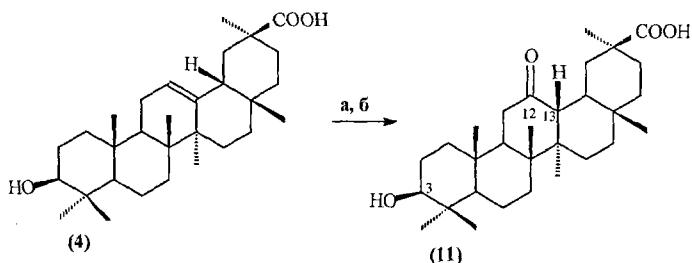
2.1.1. Озонолиз 11-дезоксо-глицирретовой кислоты и ее производных

Озонолиз 11-дезоксо-ГЛК (**4**) в CH_2Cl_2 при -60°C до появления озона на выходе из колбы и последующее восстановление продуктов реакции Zn в CH_3COOH в течение 1 ч при 0°C привели к получению смеси продуктов, которая была разделена КХ на силикагеле (СГ). Из продуктов реакции выделено в индивидуальном по ТСХ состоянии соединение (**11**) (выход 36%), которое по спектрам ЯМР ^1H и ^{13}C идентифицировано как олеан-3,12-дион-30-овая кислота (схема 1) и исходная 11-дезоксо-ГЛК (**4**). Спектр ЯМР ^1H 3,12-дикетона (**11**) характеризуется наличием сигнала $^{13}\beta\text{H}$ при 2,8 м.д. с

константой спин-спинового взаимодействия (КССВ) 4 Гц, что характерно для производных тритерпеноидов β -амиринового ряда.

При озонировании 11-дезоксо-ГЛК (4) при -60°C в смеси CH_2Cl_2 -MeOH была получена 3 β -гидрокси-олеан-12-он-30-овая кислота (16) с выходом 42%.

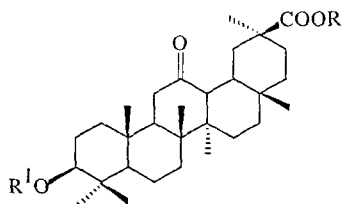
Схема 1



Условия: а) O_3 , CH_2Cl_2 , -60°C ; б) Zn/AcOH

Исчерпывающим озонлизом 3-О-ацетата 11-дезоксо-ГЛК (5) при -60°C в CH_2Cl_2 получен 12-он (17) (выход 48%). Карбонильный атом C12 в спектре ЯМР ^{13}C соединения (17) имеет значение ХС 212,7 м.д., C13 – 50,8 м.д.

Озонлиз метилового эфира 3-О-ацетата 11-дезоксо-ГЛК (5а) в CH_2Cl_2 при -60°C привел к смеси продуктов окисления, из которой выделены в чистом виде 12-он (18) (выход 32,5%) и 3-О-Ас метилглицирретата (3а) (выход 15%) в соотношении 2:1 по данным спектров ЯМР ^1H и ^{13}C .



(16) $\text{R} = \text{R}^1 = \text{H}$

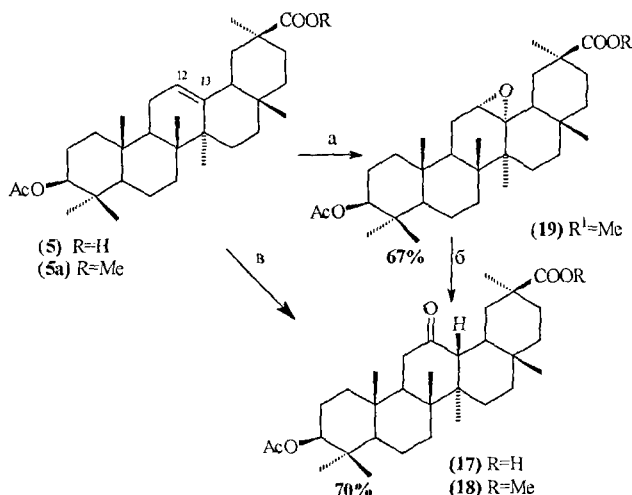
(17) $\text{R} = \text{H}; \text{R}^1 = \text{Ac}$

(18) $\text{R} = \text{Me}; \text{R}^1 = \text{Ac}$

2.1.2. Окисление производных 11-дезоксо-ГЛК мета-хлорнадбензойной кислотой

Проведено окисление производных 11-дезоксо-ГЛК (5,5а) мета-хлорнадбензойной кислотой (*m*-CPBA) в CHCl_3 или CH_2Cl_2 при $0-5^\circ\text{C}$ (схема 2). Окисление 3-О-ацетата (5а) 2 экв. *m*-CPBA в CH_2Cl_2 в течение 7 суток привело к образованию 12 α ,13 α -эпоксида (19) с выходом 67%.

Схема 2



Условия: а) 2 экв. *m*-CPBA, CH₂Cl₂, 0-5 °С; б) BF₃•Et₂O, C₆H₆, 80 °С; в) 4 экв. *m*-CPBA, CHCl₃, 0-5 °С

Для установления стереохимии эпоксидного цикла соединения (19) был проведен NOE – эксперимент и снят спектр ЯМР ¹³C без подавления протонов с определением константы C-H взаимодействия. Величина вицинальной KCCB (*J*³) между протоном при C18 и атомом углерода C12 равна 6,2 Гц, что говорит об их *цис*-расположении друг относительно друга.

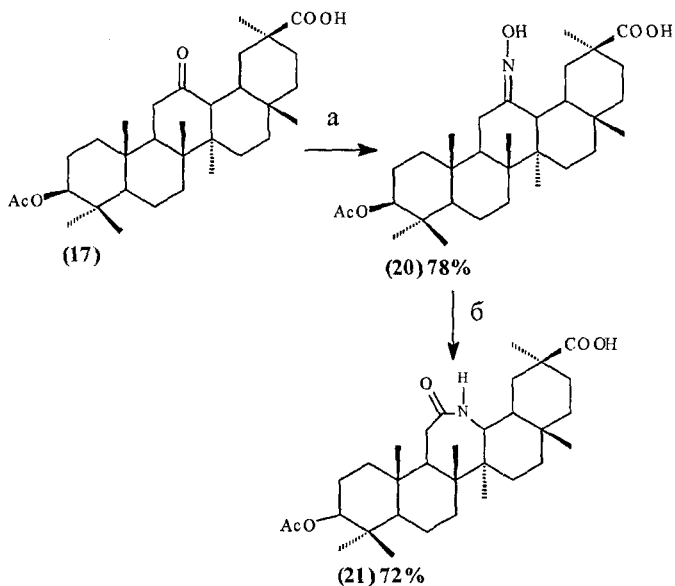
При кипячении эпоксида (19) с эфиром BF₃ в бензоле образовывался 13βH-олеан-12-он (18) с выходом 70%. При окислении 3-O-ацетата (5) избытком *m*-CPBA (4 ммоль) в CHCl₃ при 0-5 °С в течение 7 дней была получена 3β-ацетокси-олеан-13βH-12-он-30-овая кислота (17), идентичная образцу, полученному выше озонлизом.

2.2. Скелетные превращения тритерпеноидов

2.2.1. Бекмановская перегруппировка кетоксимов

Получены производные 11-дезоксо-ГЛК и олеан-9(11),12(13)-диен-30-овой кислоты с семичленными циклами А- и С- путем бекмановской перегруппировки соответствующих гидроксиминов (схемы 3-5).

Схема 3

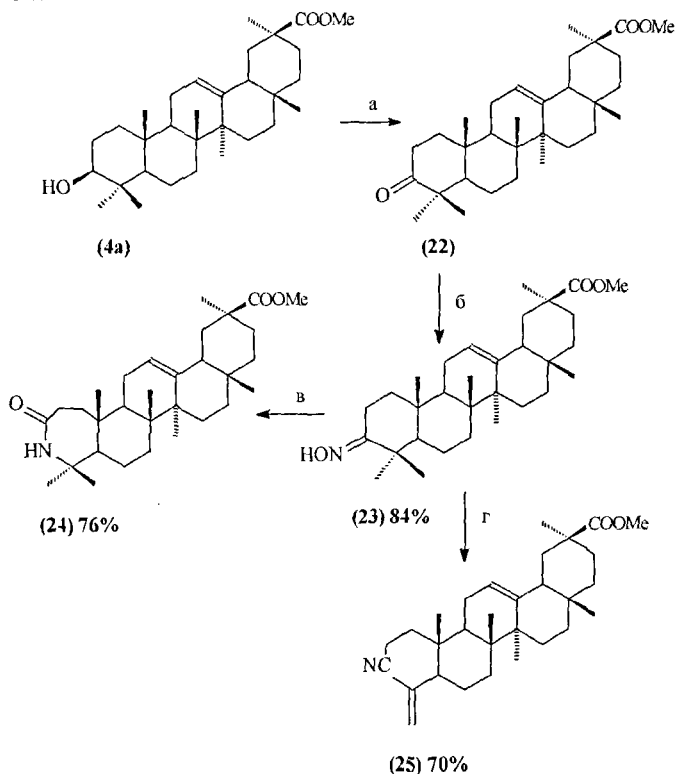


Условия: а) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Py , 115°C , 2 ч; б) SOCl_2 , CH_3CN , 4 ч.

3-О-ацетат 12-он-олеан-30-овой кислоты (**17**) был превращен в 12-гидроксиимино-производное (**20**) путем кипячения с $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ в безводном пиридине в течение 2 ч (выход 78%). Бекмановская перегруппировка гидроксиимины (**20**) под действием SOCl_2 в ацетонитриле протекала с образованием С-гомо-С-аза-производного (**21**).

Окислением метиловых эфиров 11-дезоксо-ГЛК (**4a**) и олеан-9(11),12(13)-диен-30-овой кислоты (**10a**) пиридинийдихроматом (PDC) в CH_2Cl_2 получены 3-оксо-производные (**22**) и (**26**) с выходами 70 и 65%, соответственно (схемы 4 и 5), которые путем кипячения с $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ в безводном пиридине превращали в 3-гидроксиимины (**23**) и (**27**) с выходами 82-84%. В спектрах ЯМР ^{13}C оксимов (**23**) и (**27**) наблюдается сигнал С3 при 166,5 – 166,6 м.д. (C=N-). Взаимодействие оксимов (**23**) и (**27**) с SOCl_2 в диоксане при 10°C проходило с образованием единственных продуктов реакции (**24**) и (**28**) с выходами 74-76% в результате бекмановской перегруппировки 1-го рода.

Схема 4

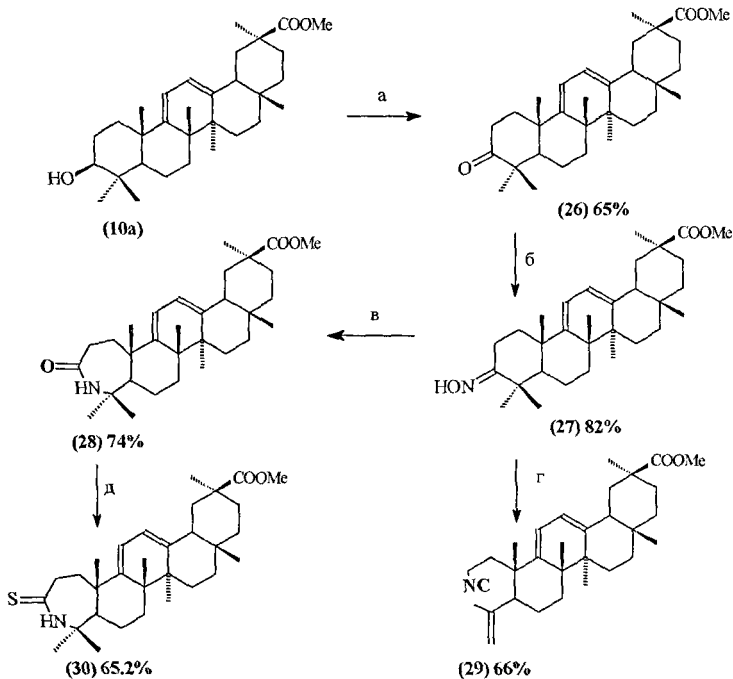


Условия: а) PDC, CH_2Cl_2 ; б) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Py, 115°C ; в) SOCl_2 , 10°C , 1% KOH; г) *p*-TsCl, Py, 115°C , 5 ч.

При нагревании оксимов **(23)** и **(27)** с *p*-TsCl в среде безводного пиридина проходила бекмановская перегруппировка 2-го рода с образованием 3-циано-3,4-секо-олеан-4-енов **(25)** и **(29)** с выходами 70 и 66 %, соответственно (схемы 4 и 5). В спектрах ЯМР ^{13}C сигнал CN группы обнаруживается при δ 121,3 м.д. (соединение **(25)**) и 120,3 м.д. (соединение **(29)**) м.д., а сигналы C4 олефиновой связи при δ 167,1 и 163,7 м.д., соответственно.

При кипячении А-гомо-4-аза-3-оксо-производного **(28)** с реактивом Лавессона в толуоле в течение 5 ч получен 3-тиолактам **(30)** с выходом 65%, в спектре ЯМР ^{13}C которого наблюдается смещение сигнала C3 со 175,3 м.д. до 162,9 м.д. в результате образования связи C=S.

Схема 5



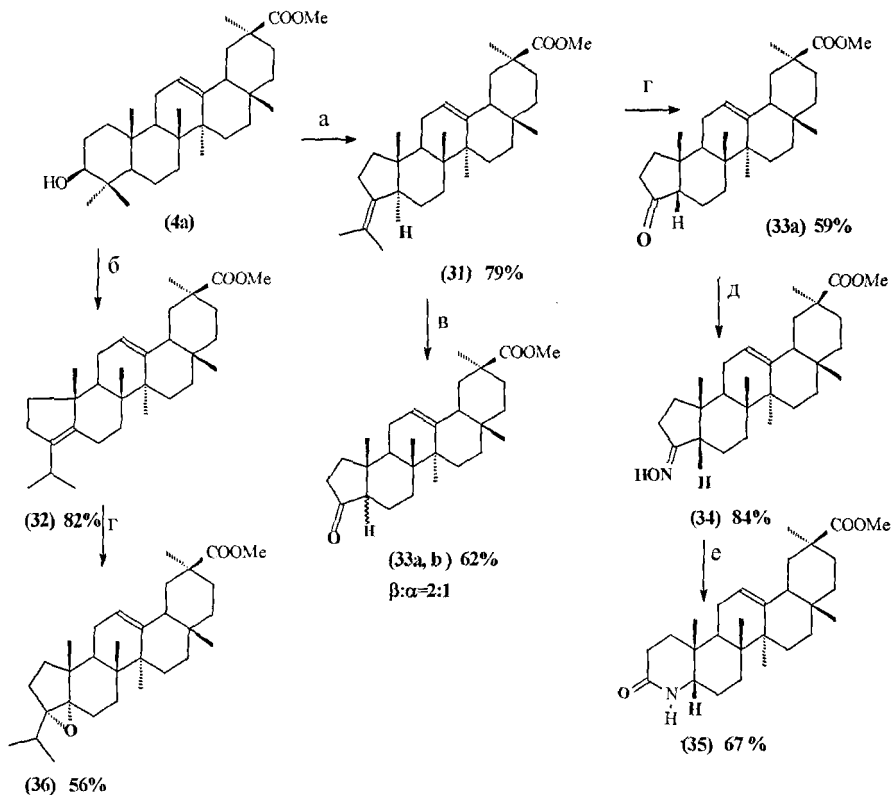
Условия: а) PDC, CHCl_3 ; б) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, 115°C , 1 ч; в) SOCl_2 , диоксан, 10°C ; 1% KOH; г) $p\text{-TsCl/Py}$, 115°C , 5 ч;) Реактив Лавессона, толуол, 5 ч.

2.2.2. Синтез и превращения А-циклопентановых производных 11-дезоксо-ГЛК

Нами впервые осуществлен синтез производных 11-дезоксо-ГЛК (**4**) с пентациклическим кольцом А, которые представляют собой новую группу биологически активных веществ, лишенных эффекта «псевдоальдостеронизма», с использованием в качестве субстрата метилового эфира (**4а**) (схема 6).

Сужение цикла А в метиловом эфире 11-дезоксо-ГЛК (**4а**) провели с помощью PCl_5 в смеси бензола - толуола 1:1 с использованием классической перегруппировки Вагнера - Мейервейна, которая протекала по двум направлениям в зависимости от температуры реакции: при $-10 - 0^\circ\text{C}$ образовывался метиловый эфир 3-изопропилиден-А-нео-5 α H-олеан-12-ен-30-овой кислоты (**31**) с выходом 79,2 %. Проведение реакции дегидратации соединения (**4а**) PCl_5 при $5 - 10^\circ\text{C}$ привело к эндо-изомеру А-норолеан-3(5)-ену (**32**) с выходом 82,5 %.

Схема 6



Условия: а) PCl_5 , $-10-0^\circ\text{C}$; б) PCl_5 , $5-10^\circ\text{C}$; в) O_3 , -60°C ; г) RuO_4 , CCl_4 ; Zn/AcOH ; д) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Py ; е) SOCl_2 , диоксан

При окислении изопропилиденового производного (31) в CCl_4 избытком RuO_4 получена смесь изомерных $5\beta\text{H}$ - и $5\alpha\text{H}$ -А-норкетонов (33а, б), которые были выделены КХ на Al_2O_3 в виде смеси в соотношении 2:1 по данным ЯМР-спектроскопии с общим выходом 62%.

Перекристаллизацией смеси изомеров (33 а, б) из EtOH получили чистые монокристаллы $5\beta\text{H}$ -А-норкетона (33а), охарактеризованного рентгеноструктурным анализом* (рис.1).

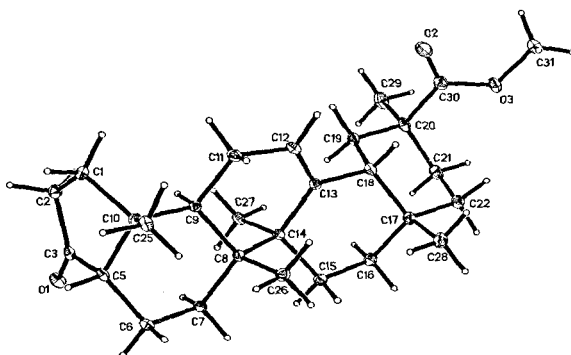


Рис. 1. Рентгеноструктурный анализ метилового эфира 4,23,24-тринор-3-оксо-5 β H-олеан-12-ен-30-овой кислоты (**33a**)

Парциальный озонлиз соединения (**31**) при -60°C (~ 1 ммоль озона) в CH_2Cl_2 привел к образованию только 5 β H-A-норкетона (**33a**), выделенного КХ с выходом 59%. В реакционной смеси содержался также исходный тритерпеноид (**31**) (30%). В спектре ЯМР ^{13}C чистого 5 β H-A-норкетона (**33a**) присутствует только один сигнал С3 (C=O) при 221,4 м.д., сигнал 5 β H протона имеет значение ХС 1,82 м.д. (синглет). При нагревании А-норкетона (**33a**) с $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ в безводном пиридине в течение 1 ч получен оксим (**34**) с выходом 84 %. В спектре ЯМР ^{13}C данного соединения сигнал С3 смещается до 167,3 м.д. (C=N) в результате образования имина.

Бекмановская перегруппировка оксима (**34**) под действием SOCl_2 в абсолютном диоксане протекала с образованием лактама (**35**) (выход 67%). В соединениях (**34**) и (**35**) цис-сочленение колец А/В не изменяется, что подтверждается сохранением сигнала 5 β H при 1,86 м.д. в виде синглета.

В результате парциального озонлиза соединения (**32**) при -60°C получен 3 α ,5 α -эпоксид (**36**) с выходом 56%. Из реакционной смеси КХ выделен также исходный эндо-изомер (**32**), идентифицированный по ТСХ с меткой. Стереохимия эпоксида (**36**) следует из наличия стерически затрудненной двойной связи С3(5) в исходном соединении (**32**), а также наличия в спектре ЯМР ^{13}C ХС атомов С3 и С5 при δ 75,1 и 75,9 м.д.

2.2.3. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C А-циклопентановых производных 11-дезоксо-ГЛК

С использованием ЯМР спектрометра высокого разрешения Varian Unity Inova с рабочей частотой 400 МГц (^1H) и 125 МГц (^{13}C)* были исследованы спектры ЯМР производных 11-дезоксо-ГЛК (**31**), (**32**) и (**36**) и проведено полное отнесение сигналов протонов методами двумерной (2D)-гомоядерной НН COSY и гетероядерной СН корреляционной спектроскопии

в режимах HSQC и HMBC. Значения ХС в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C высокого разрешения исследованных соединений приведены в табл. 1.

Как видно из данных табл. 1, в спектре ЯМР ^{13}C соединения (31) имеются характеристические сигналы олефиновых атомов С3 и С4 при 135,8 и 120,9 м.д. Два синглетных сигнала метильных протонов изопропилиденовой группы в спектре ЯМР ^1H имеют значения ХС 1,62 и 1,81 м.д. Значения ХС атомов углерода циклопентанового кольца А подтверждают 5аН-конфигурацию и транс-сочленение колец А/В в соединении (31).

В спектре ЯМР ^{13}C эпоксида (36) появляются сигналы С-О-связей при 75,1 и 75,9 м.д., сигналы олефиновых атомов углерода С3 и С5 отсутствуют. В спектре ЯМР ^1H протоны Н2 обнаруживаются при δ 1,73 и 1,61 м.д., протоны Н4 – при δ 1,77 м.д. Двойная связь в кольце С при парциальном озонлизе не озонируется, о чем свидетельствует сохранение сигналов атомов С12 и С13 в спектре ЯМР ^{13}C соединения (36).

Таблица 1

Значение химических сдвигов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C высокого разрешения (δ , м.д.) производных 11-дезоксо-ГЛК с циклопентановым кольцом А (пиридин- d_5 , 310°К, TMS – внутренний стандарт)

Атом	(31)		(32)		(36)	
	$\delta\text{с}$	δH	$\Delta\text{с}$	δH	$\delta\text{с}$	δH
1.	39.6	1.52 1.02	41.9	1.72 1.47	35.3	1.17 1.17
2.	29.0	2.10 2.23	28.4	2.28 2.21	23.9	1.73 1.61
3.	135.8	-	136.1	-	75.1	-
4.	120.9	-	26.8	2.72	28.9	1.77
5.	56.0	1.73	140.9	-	75.9	-
6.	23.4	1.60 2.19	20.0	2.37 1.97	20.2	2.02 1.33
7.	32.9	1.31 1.50	32.4	1.45 1.37	29.4	2.02 1.33
8.	40.0	-	40.7	-	40.4	-
9.	45.6	1.79	46.6	1.87	41.3	2.25
10.	44.2	-	49.8	-	41.3	-
11.	25.9	2.03 1.86	25.6	2.03 1.84	25.3	2.03 1.79
12.	123.1	5.42	123.5	5.45	123.0	5.44
13.	145.3	-	144.8	-	145.4	-
14.	42.0	-	42.2	-	42.5	-
15.	26.8	1.82 0.99	26.7	1.82 1.02	26.7	1.83 1.03
16.	27.4	2.02 0.88	27.4	1.99 0.97	27.4	2.00 0.88
17.	32.4	-	32.4	-	32.5	-

18.	49.1	2.14	49.3	2.14	49.2	2.14
19.	43.3	2.08 1.76	43.2	2.06 1.74	43.1	2.07 1.75
20.	44.5	-	44.5	-	44.6	-
21.	31.6	2.07 1.39	31.6	2.06 1.37	31.5	2.08 1.38
22.	38.9	1.49 1.40	38.6	1.49 1.37	38.8	1.49 1.38
23.	23.0	1.62	21.5	0.97	18.7	1.08
24.	19.7	1.81	22.1	1.01	19.1	0.95
25.	15.0	0.75	19.0	1.00	18.0	0.91
26.	17.2	1.02	16.0	1.09	16.6	1.11
27.	26.2	1.22	25.8	1.14	26.2	1.30
28.	28.5	0.87	28.5	0.87	28.5	0.88
29.	28.6	1.22	28.5	1.16	28.5	1.18
30.	177.4	-	177.3	-	177.3	-
Me	51.5	3.71	51.5	3.68	51.1	3.70

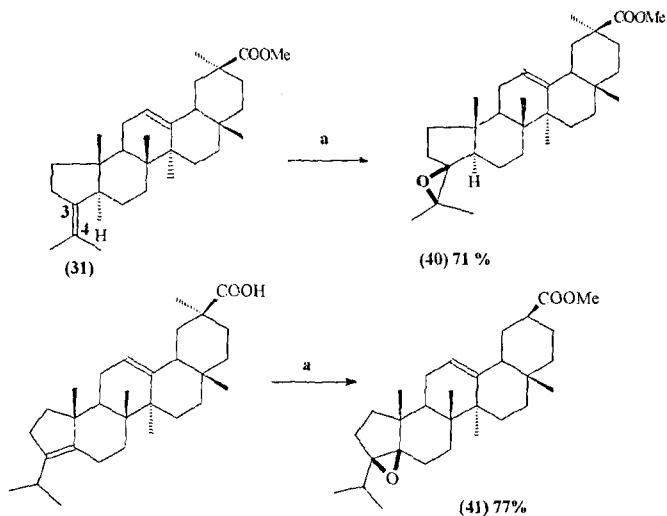
Сигналы C1 и C2 циклопентанового фрагмента в спектре ЯМР ^{13}C эпоксида (36) смещены в более сильное поле ~ на 4 - 5 м.д. и коррелируют с протонами при 1,17; 1,73 и 1,61 м.д., соответственно.

2.2.4. Окисление А-циклопентановых производных тритерпеноидов диметилдиоксираном

Хорошо известным стерео- и региоселективным окислителем является диметилдиоксиран (DMD), позволяющий окислять вторичные спиртовые группы и эпоксидировать двойные связи. Мы провели окисление 3-изопропил-А-нео-5 α H-олеан-12-ен-30-овой кислоты (31) и А-норолеан-3,12-диен-3-(2-изопропильного)-производного (32) DMD в смеси ацетона-хлористого метилена (1:1) при 20-22 °С. Основным продуктом окисления соединения (31) является А-нор-3 β ,4 β -эпоксид (40) (выход 71%) (схема 8), в спектре ЯМР ^{13}C которого исчезают сигналы олефиновых атомов C3 и C4, но появляются сигналы атомов углерода эпоксидного цикла при 77,2 (C³-O) и 57,9 (C⁴-O) м.д.

Окисление соединения (32) DMD в аналогичных условиях также привело к 3 β ,5 β -эпоксиду (41) с выходом 77%, отличающемуся от образца 3 α ,5 α -эпоксида (36), полученного парциальным озонлизом, по ТСХ и спектрам ЯМР ^1H и ^{13}C .

Схема 8



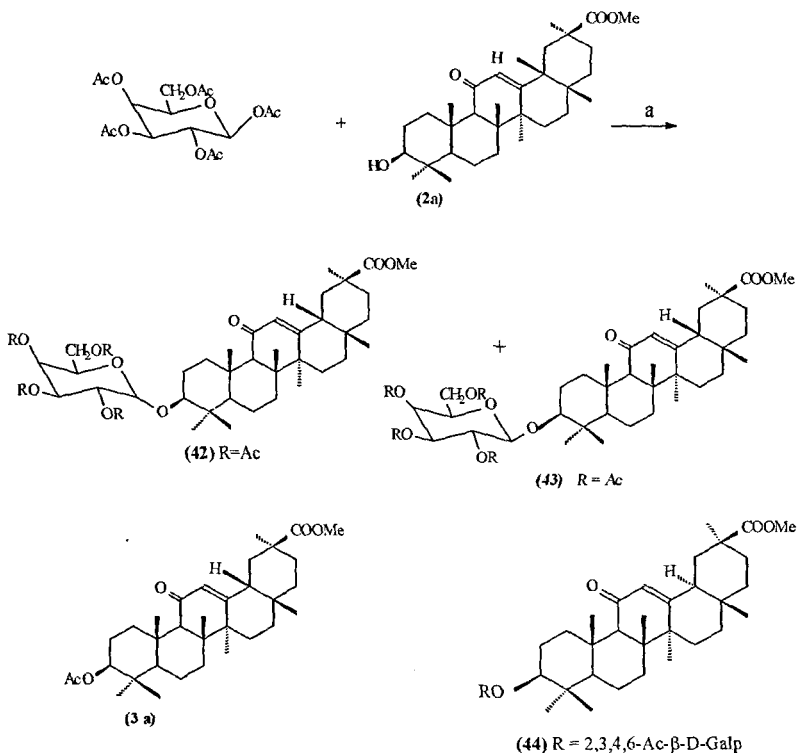
Условия: а) DMD, 20-20 °С, ацетон-хлористый метилен

2.3. Гликозилирование тритерпеноидов перацетилированными сахарами при активации SnCl_4

Синтез тритерпеновых О-гликозидов, моделирующих различные природные сапонины, в частности, гликозиды лекарственных растений (*Glycyrrhiza*, *Panax*, *Vulpurum spp.* etc.), представляет интерес как с точки зрения получения аналогов биоактивных природных соединений, так и с точки зрения изучения особенностей гликозилирования полифункциональных природных сапогенинов. Известно, что гликозилирование усиливает биодоступность природных соединений и синтетические тритерпеновые гликозиды можно рассматривать как пролекарства. Поэтому разработка новых эффективных методов гликозилирования сложных полифункциональных природных соединений, пригодных для получения аналогов природных гликозидов, является одной из актуальных проблем современного гликозидного синтеза.

С целью изучения зависимости структура-активность нами осуществлен синтез 3-О-гликозидов - модифицированных аналогов ГК, представляющих интерес для изучения зависимости структура-активность. Гликозилирование 18β- и 18,19-дегидро-ГЛК в виде их метиловых эфиров (2а, 9а) провели легко доступными гликозильными донорами (ГД) - пента-О-ацетатами β-D-галакто- и -глюкопираноз при активации кислотой Льюиса – SnCl_4 , широко используемой в синтезе N-гликозидов (нуклеозидов) (схема 9).

Схема 9



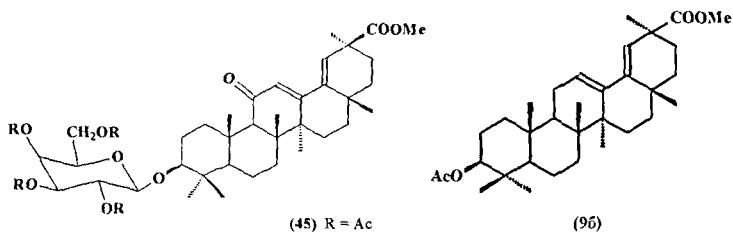
Условия: а) SnCl₄, CH₃CN-ДХЭ, молекулярные сита 4 Å, -20→20 °С

Для подбора оптимальных условий проведения реакции гликозилирования варьировались соотношения тритерпеноидов, ГД и активатора (АК), температурный режим и время реакции. Гликозилирование МеГЛК (2а) проводили в смеси ацетонитрила – дихлорэтана (ДХЭ) в интервале температур от -20 °С до 20 °С.

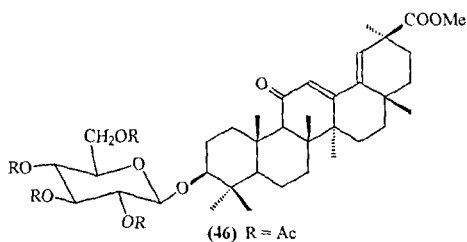
При проведении реакции гликозилирования при -20→-10 °С (2 ч) с использованием 6 ммоль активатора (SnCl₄) образовывалась смесь α- и β-галактопиранозидов (42) и (43) с общим выходом 24,5% с соотношением α/β-аномеров 6:1. Смесь гликозидов была разделена КХ на СГ. В качестве побочного продукта реакции получены незначительные количества 3-О-ацетата МеГЛК (3а).

Гликозилирование МеГЛК (2а) при соотношении реагентов ГД/МеГЛК/АК = 2,5:2:12 ммоль в присутствии молекулярных сит 4 Å при -20→20 °С привело к увеличению выхода гликозидной фракции (74,2%), причем выход β-аномера (43) тоже увеличился (соотношение α/β=1:2).

Однако, реакция сопровождалась изомеризацией образующегося 3-О-β-D-галактопиранозида MeГЛК (43) в 18α-стереоизомер (44) под действием кислоты Льюиса.

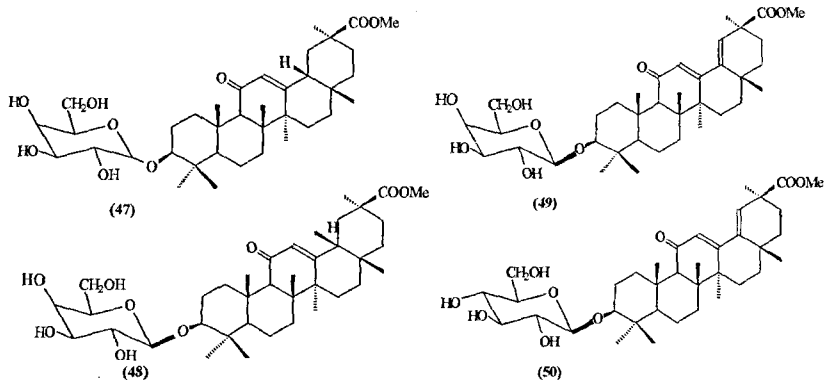


Реакция гликозилирования метилового эфира 18,19-ГЛК (9a) при оптимальном соотношении реагентов при -5-0 °С течение 2-4 ч протекала с образованием только β-гликозида (45), выход которого зависит как от времени проведения реакции, так и количества активатора. Выходы β-галактопиранозида 18,19-дегидро-ГЛК (45) составили 36,2 – 61,3 %. В качестве минорного побочного продукта реакции образуется 3-О-ацетат (96).



Гликозилированием метилового эфира (9a) пента-О-ацетатом β-D-глюкопиранозы в присутствии SnCl₄ при -5-0 °С получен β-D-глюкопиранозид (46) с выходом 51,3%. Структура полученных гликозидов была подтверждена спектральными методами (ИК, УФ, ЯМР ¹H и ¹³C). В спектре ЯМР ¹³C α-D-галактопиранозида (42) ХС аномерного атома углерода равен 94,1 м.д., β-гликозида (43) - 103,5 м.д., как и в спектре ГК.

Для гликозида (46) сделано полное отнесение сигналов протонов с использованием одно- и двумерных экспериментов (H-H COSY, H-C HSQC, HMBC) на ЯМР спектрометре высокого разрешения Varian Inova (600 МГц – ¹H и 150 МГц – ¹³C). В области слабого поля спектра ЯМР ¹H гликозида (46) сигнал аномерного протона наблюдается при 4,93 м.д. в виде дублета с КССВ 7,8 Гц, что подтверждает β-конфигурацию гликозидной связи. Аксиальному протону при C 2' принадлежит триплет при 5,45 м.д. с КССВ 8,9 Гц, характеризующий взаимодействие данного протона с двумя соседними протонами с экваториальным и аксиальным расположением при C1' и C3'.



Деацетилированием перацетилированных гликозидов **(42,43,45,46)** 0,1N NaOMe в смеси метанола-хлористого метилена получили модельные гликозиды **(47-50)** с выходами 80-83%.

3. Биологическая и фармакологическая активность производных тритерпеноидов*

Установлено, что модельные тритерпеновые β -гликозиды **(47-49)** обладают гепатопротекторной активностью *in vitro*, увеличивают выживаемость клеток гепатоцитов человека HepG2 и снижают выделение лактатдегидрогеназы при алкогольной интоксикации. Исследованные соединения обладают слабовыраженной антиоксидантной активностью, но существенно снижают концентрацию белка-фактора некроза опухолей TNF- α (tumor necrosis factor) при этанольном гепатите, что говорит об их выраженных противовоспалительных свойствах.

Найдено, что гликозид **(47)** проявляет средневывраженную анти-ВИЧ-1 активность на модели первично инфицированных ВИЧ-1 лимфоидных клеток MT-4 и имеет более высокий индекс селективности по сравнению с ГК.

3-Оксим 11-дезоксо-ГЛК **(23)** обладает гепатопротекторной активностью *in vivo* (на крысах) на модели острого гепатита, вызванного внутрибрюшинным введением CCl_4 . Данное соединение при пероральном введении в дозе 50 мг/кг усиливает желчегонную активность печени и снижает уровень билирубина в сыворотке крови животных.

3-Оксо-производные 11-дезоксо-ГЛК **(22)** и олеан-9,11-диен-30-овой кислоты **(26)** предохраняют слизистую оболочку желудка крыс от изъязвления на модели индометациновых язв аналогично карбенексолону при введении в равных дозах (50 мг/кг).

Таким образом, среди исследованных производных ГЛК и ее аналогов найдены вещества, обладающие гепатопротекторной, противоязвенной и анти-ВИЧ-1 активностью.

*Спектры ЯМР высокого разрешения ^1H (400 и 600 МГц) и ^{13}C (125 и 150 МГц) сняты в Институте фармацевтической химии и технологии Университета им. К.Франца (г. Грац, Австрия) и Школе химических и фармацевтических наук Университета Восточной Англии; б) рентгеноструктурный анализ выполнен в Центре рентгеноструктурных исследований ИНЭОС РАН; в) изучение гепатопротекторной и антиоксидантной активности производных тритерпеноидов *in vitro* проведено в В Китайском медицинском университете г. Тайчунг (Тайвань); гепатопротекторные свойства оксима 11-дезоксо-ГЛК (23) *in vivo* – в лаборатории новых лекарственных средств Института органической химии УНЦ РАН; противоязвенной активности – в Башкирском государственном медицинском университете; анти-ВИЧ-1 активности – в Отделе ретровирусов ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская область).

ВЫВОДЫ

1. Из тритерпеновой фракции экстракта корней солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisher) сибирских популяций выделены и идентифицированы в виде метиловых эфиров пять тритерпеновых кислот, основной из которых является глицирретовая кислота (ГЛК). 24-Окси-11-дезоксо- и 21,24-диокси-11-дезоксо-ГЛК выделены из данного вида солодки впервые.

2. Проведены окислительные превращения 11-дезоксо-ГЛК и ее производных под действием озона, мета-хлорнадбензойной кислоты и диметилдиоксирана с получением новых тритерпеноидов, содержащих дополнительные кислородсодержащие (оксо-, эпокси) функциональные группы.

3. Осуществлены скелетные трансформации тритерпеноидов по кольцам А и С с получением новых структурных аналогов с измененным пентациклическим скелетом молекул. Впервые синтезированы А-гомо-А-аза-производные и 3-циано-3,4-секо-олеан-5-ены на основе 11-дезоксо-ГЛК и олеан-9,12-диен-30-овой кислоты. Предложена схема получения С-гомо-С-аза-производного 12-оксо-олеанан-30-овой кислоты.

4. Проведены скелетные и окислительные превращения 11-дезоксо-ГЛК по кольцу А с получением 4,23,24-нортритерпеновых производных с cis-сочленением циклов А и В. Методами ЯМР спектроскопии высокого разрешения ^1H (400 МГц) и ^{13}C (125 МГц) впервые сделано полное отнесение сигналов протонов и атомов углерода в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C А-циклопентановых производных.

5. Предложен простой метод получения тритерпеновых 1,2-трансгликозидов путем гликозилирования тритерпеноидов пер-О-ацетатами моносахаридов при активации SnCl_4 в смеси ацетонитрила-дихлорэтана в присутствии молекулярных сит.

6. Среди новых тритерпеновых производных выявлены вещества, обладающие гепатопротекторной, противоязвенной и анти-ВИЧ-1 активностью.

Основное содержание работы изложено в публикациях:

1. Михайлова Л.Р., Худобко М.В., Балтина Л.А., Куковинец О.С., Мавродиев В.К., Галин Ф.З. Озонолиз 11-дезоксо-глицирретовой кислоты и ее производных. // Химия прир. соед. – 2007. - № 5. - С.469-472.
2. Михайлова Л.Р., Балтина Л.А., Кондратенко Р.М., Kupert O., Спирихин Л.В., Галин Ф.З., Толстиков Г.А.. Синтез и спектры ЯМР высокого разрешения А-нор-производных 11-дезоксо-глицирретовой кислоты. // Химия прир. соед. – 2006. - № 5. - С. 445-448.
3. Kondratenko R.M., Mikhailova L.R., Baltina L.A., Stolyarova O.V., Baschenko N.Z., Baltina L.A., jr., Friedman S.M., Plyasunova O.A., Pokrovskiy A.G., Tolstikov G.A. Transformations and Bioactivity of Major Triterpenoids of Licorice. // *Drugs of the Future*. - 2004. - V.29. - Suppl. A. - P. 86.
4. Кондратенко Р.М., Абдюшева Л.Р., Балтина Л.А., Насыров Х.М., Толстиков Г.А. Новые производные глицирретовой кислоты как потенциальные антиоксиданты. // Тезисы докл. VI Международной конф. «Биоантиоксидант». – Москва, 2002 г. - С.288-289.
5. Kondratenko R.M., Baltina L.A., Mikhailova L.R., Nepogodiev S.A., Field R.A.. // *Conference Proceedings of 5th International Symposium on the Chemistry of Natural Products*. - Tashkent Uzbekistan, 2003. - P. 130.
6. Балтина Л.А., Михайлова Л.Р., Кондратенко Р.М., Непогодьев С.А., Карта К.П., Филд Р.А. Синтез модельных тритерпеновых гликозидов – аналогов глицирризиновой кислоты. // Тезисы докл. Четвертого Всероссийского симпозиума по органической химии «Органическая химия – упадок или возрождение?». - Москва, 2003 г. - 2003. С. 11.
7. Балтина Л.А., Кондратенко Р.М., Михайлова Л.Р., Насыров Х.М., Покровский А.Г., Плясунова О.А., Толстиков Г.А., Непогодьев С., Филд Р. Поиск новых биологически активных веществ для медицины среди производных и модифицированных аналогов глицирризиновой кислоты. // Тезисы докл. IV Всероссийского научного семинара и Молодежной научной школы «Химия и медицина». – Уфа, 2003 г. – С.51-52.
8. Baltina L., Kondratenko R., Flekhter O., Mikhailova L., Medvedeva N., Galin F., Tolstikov G. Selective Transformations of Bioactive Natural Triterpenoids. // *Book of Abstracts of 13th European Symposium on Organic Chemistry*. - Cavtat-Dubrovnic, Croatia, 2003. - OC 45. - P.116.
9. Балтина Л.А., Флехтер О.Б., Кондратенко Р.М., Медведева Н.И., Михайлова Л.Р., Галин Ф.З., Поройков В.В., Бореко Е.И., Покровский А.Г., Басченко Н.Ж., Толстиков Г.А., Кунерт О. Дизайн, синтез и оценка биологической активности новых производных и аналогов растительных

- тритерпеновых веществ. // Тезисы докл. III Всероссийской конференции «Химия и технология растительных веществ». - Саратов., 2004. - С. 137-138.
10. Kondratenko R.M., Baltina L.A., Mikhailova L.R., Baltina L.A., jr., Stolyarova O.V., Tolstikov G.A., Nepogodiev S.A., Field R.A., Kunert O., Plyasunova O.A., Pokrovskiy A.G., Hover H., Cinatl J. Synthesis of Novel Glycyrrhizic and Glycyrrhetic Acid Derivatives with Positive Antiviral Activity. // In the Book of Abstracts of the 2nd International Conference on Natural Products and Physiologically Active Substances (ICNPAS-2004) and 3rd EuroAsian Heterocyclic Meeting "Heterocycles in Organic and Combinatorial Chemistry" (ЕАНМ-2004). - Novosibirsk, Russia, 2004. - P.24.
11. Михайлова Л.Р., Артелина А.В., Балтина Л.А. (мл.), Столярова О.А. Направленные трансформации минорных тритерпеноидов солодкового корня. // Тезисы докл. VIII молодежной научной школы-конференции по органической химии. – Казань, 2005 г. - С. 379.
12. Baltina L., Mikhailova L., Plyasunova O., Kunert O., Haslinger E. Cinatl J. Target transformations of licorice root triterpenoids for antiviral activities studies. // In Book of Abstr. International Symposium on Chemistry, Biology and Medicine. – Cyprus, 2006. – P 06.
13. Михайлова Л.Р., Худобко М.В., Балтина Л.А., Галин Ф.З., Толстиков Г.А. Скелетные и окислительные превращения минорных тритерпеноидов солодкового корня. // Тезисы докл. IV Всероссийской научной конф. «Химия и технология растительных веществ». - Сыктывкар, 2006 г. - С.135.
14. Baltina L., Stolyarova O., Mikhailova L., Baltina L., Tolstikov G. Selective Transformations of Licorice Triterpenoids as a Basis for the Production of New Medicinal Agents with Target Biological Activity. // Abstr. from the XIXth Intern. Symp. on Mediical Chemistry. - Istanbul, Turkey, 2006. - P.165.
15. Михайлова Л.Р., Худобко М.В., Балтина Л.А. (мл.). Синтез А-аза-производных минорных тритерпеноидов солодкового корня. // Тезисы докл. XI Молодежной конференции по органической химии, посвященной 110-летию со дня рождения И.Я.Постовского. - Екатеринбург, 2008 г. - С. 92.

Соискатель:



Михайлова Л.Р.

Михайлова Лилия Рафаиловна

**ВЫДЕЛЕНИЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ НЕКОТОРЫХ
ТРИТЕРПЕНОИДОВ СОЛОДКИ УРАЛЬСКОЙ**

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Лицензия №0177 от 10.06.96 г.

Подписано в печать 16.02.2009 г.

Бумага офсетная. Отпечатано на ризографе.

Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Усл.-печ. л. 1,5. Уч.-изд. л. 1,7.

Тираж 105 экз. Заказ № 439.

450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
ГОУ ВПО «Башгосмедуниверситет РОСЗРАВА»