

А. А. Володькин, Г. Е. Заиков, Л. Н. Курковская, Н. М. Евтеева,
С. М. Ломакин, Е. Ю. Паршина, Л. Я. Гендель, З. М. Рахбанова, А. Ф. Яруллин

СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ В РЕАКЦИИ ЭТЕРИФИКАЦИИ 2-(N-АЦЕТИЛАМИД)-3-(3',5'-ДИ-ТРЕТ.БУТИЛ-4'-ГИДРОКСИФЕНИЛ)ПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Ключевые слова: 2-(N-ацетиламид)-3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)пропионовая кислота, этерификация, антиоксидант.

В реакции этерификации 2-(N-ацетиламид)-3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)пропионовой кислоты спиртами (MeOH, EtOH, isoPrOH, n-BuOH, n-C₉H₁₇OH) в присутствии SOCl₂ синтезированы 5 антиоксидантов с выходами 90-94%. Антиокислительные свойства по величине κ_7 на уровне $2 \cdot 10^6$ л.моль⁻¹.с⁻¹, что выше, чем для метилового эфира 3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)пропионовой кислоты ($\kappa_7 = 2 \cdot 10^4$ л.моль⁻¹.с⁻¹). Выполнены квантово-химические расчеты структур метилового эфира 2-(N-ацетиламид)-3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)пропионовой кислоты, которые объясняют связь энтропии и структуры с антиокислительными свойствами.

Keywords: 2-(N-acetylamid)-3-(3',5'-di-tert.butyl-4'-hydroxyphenyl) propionic acid, esterification, antioxidant.

In the reaction esterification 2-(N-acetylamid)-3-(3',5'-di-tert.butyl-4'-hydroxyphenyl) propionic acid by alcohols (MeOH, EtOH, isoPrOH, n-BuOH, n-C₉H₁₇OH) in the presence of SOCl₂ 5 antioxidants with yields of 90-94 % are synthesised. Antioxidative properties of compounds on value κ_7 at level $2 \cdot 10^6$ l.mol⁻¹.s⁻¹ that above, than for methyl ester (3',5'-di-tert.butyl-4'-hydroxyphenyl) propionic acid ($\kappa_7 = 2 \cdot 10^4$ l.mol⁻¹.s⁻¹). Are executed quantovo-chemical calculations of structure of methyl ester 2-(N-acetylamid)-3-(3',5'-di-tert.butyl-4'-hydroxyphenyl) propionic acid which explain communication of entropy and structure with antioxidative properties.

Введение

Публикации последних лет свидетельствуют об актуальности синтеза биологически активных веществ со свойствами антиоксидантов [1-4]. В развитии данного направления перспективными являются синтез и исследования свойств эфиров 1-(N-ацетиламид)-2-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)пропионовой кислоты. Ранее исследованы свойства эфиров 3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)пропионовой кислоты, антиокислительные свойства которых по ряду параметров близки к свойствам 4-метил-2,6-ди-трет.бутилфенола (константа ингибирования $\kappa_7 \approx 2 \cdot 10^4$ л.моль⁻¹.с⁻¹). Наличие в молекуле эфиров 2-(N-ацетиламид)-3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)-пропионовой кислоты ацетиламино- группы приводит к изменению антиокислительных свойств, а по величине константы ингибирования приближаются к эффективности природного антиоксиданта- токоферола ($\kappa_7 \approx 2 \cdot 10^6$ л.моль⁻¹.с⁻¹) [5]. На основании квантово-химических расчетов структур метиловых эфиров (3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)-пропионовой и 2-(N-ацетил-амид)-3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)-пропионовой кислот установлено, что различия в антиокислительных параметрах могут быть связаны с геометрией связей между ядрами атомов в молекуле и влиянием электронного поля на переход одного из электронов молекулы антиоксиданта на свободную орбиталь пероксильного радикала.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ¹H записывали на приборе "Avance -500 Bruker" относительно TMS. ИК-спектры записывали на спектрометре "PERKIN-ELMER 1725-X в кристаллах методом диффузного отражения. Для ЖХ использовали прибор «Bruker

LC-31», колона IBM Cyano, элюент – гексан-пропанол -этилацетат (8 :1:1, об.), скорость 0.4 мл·мин⁻¹. Биологические исследования проводили с эритроцитами крови белых беспородных крыс по методу [7]. Морфологические изменения эритроцитов под действием соединений в концентрации 10^{-3} – 10^{-5} моль·л⁻¹ фиксировали методом оптической микроскопии. Квантово-химические расчеты проводили с использованием программы «Mорас2009» [8]. Оптимизацию геометрических параметров молекулярных структур проводили с использованием параметра EF по методу Хартри-Фока.

2-(N-ацетиламид)-3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)пропионовой кислоты (1) получали по методу [6], т.пл. 203-204 °С; SOCl₂ марки «Serva» (Германия), очищали фракционированием, т.кип. 79 °С.

Метилловый эфир 2-(N-метиламид)-3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)пропионовой кислоты (2) К раствору 3.35 г (0.01 моль) соединения **1** в 30 мл MeOH прибавили 5 мл SOCl₂, выдерживали при 20 °С в течение 15 мин, растворитель испарили, к остатку прибавили 20 мл воды, нагрели до кипения и фильтровали. Остаток на фильтре кристаллизовали из спирта. Выход 3.3 г (94%); т.пл. 148-149 °С Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д. J/Гц) 1.44 (с, 18 H, ^tBu); 2.01 (с, 3 H, COCH₃); 3.06 (с, 1H, CH₂); 3.08 (с, 1H, CH₂); 3.78 (с, 3H, O-CH₃); 4.86 (м, 1H CH-CH₂); 5.14 (с, 1 H, OH); 5.91 (с. ушир, 1 H, NH); 6.87 (с, 2H, Ar); ИК-спектр, ν /см⁻¹: 3367 (NHCO); 3187ушир.(OH); 2960 (CH); 1739 (COO-); 1649 (CONH); 1213 (C-O-C). Найдено %: C 68.66; H 8.74; N 3.77. C₂₀H₃₁NO₄. Вычислено %: C 68.74; H 8.94; N 3.85

Этиловый эфир 2-(N-метиламид)-3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)-пропионовой кислоты (3) получали аналогично из 3.35 г (0.01

моль) соединения **1**, 10 мл EtOH и 5 мл SOCl_2 . Выход 3.3 г (90%); т.пл. 135-136 °С. Спектр ЯМР ^1H (ацетон d_6 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 1.68 (т, 3H, CH_3CH_2 , $J=7.1$ Гц) 1.42 (с, 18H, ^tBu); 1.91 (с, 3H, COCH_3); 2.02 (д.д. 1H_a, $J=6.2$ Гц); 3.11 (д.д. 1H_b, $J=6.3$ Гц); 4.09 (2H, CH_2CH_2 , $J=7.1$ Гц) 4.60-4.64 (м, 1H_c); 5.98 (с, 1H, OH); 6.95 (с, 2H, Ar); 7.34 (д, 1H, NH, $J=7.15$ Гц). ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3354 (NHCOCH_3); 3189 уш.(OH); 1732 (COOC_2H_5); 1647 (HNCO). Найдено (%): C, 69.59; H, 9.13; N 3.94; $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N O}_4$. Вычислено (%): C, 69.39; H, 9.15; N, 3.85

изо-Пропиловый эфир 2-(N-метиламид)- 3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)пропионовой кислоты (4) получали аналогично из 3.35 г (0.01 моль) соединения **1**, 10 мл изо-PrOH и 5 мл SOCl_2 . Выход 3.4 г (90%), т.пл. 127-128 °С ЯМР ^1H (ДМСО d_6 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0.99 (с, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1.14 (с, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1.36 (с, 18H, ^tBu); 1.83 (с, 3H, COCH_3); 2.81 (с, 1H, $\text{CH}-\text{HCH}$); 2.83 (с, 1H, $\text{HCH}-\text{CH}$); 4.32 (м, 1H, $\text{CH}-\text{CH}_2$); 4.76 (м, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 6.77 (с, 1H, OH); 6.91 (с, 2H, Ar); 8.27 (д, 1H, NH, $J=7.45$ Гц) ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3356 (NHCO); 3197 уш.(OH); 2949 (CH); 1719 (COO-); 1640 (CONH); 1202 (C-O-C). Найдено %: C 69.88; H 9.32; N 3.77. $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{NO}_4$. Вычислено %: C 69.99; H 9.34; N 3.71

н-Бутиловый эфир 2-(N-метиламид)- 3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)пропионовой кислоты (5) получали аналогично из 3.35 г (0.01 моль) соединения **1**, 10 мл н-BuOH и 5 мл SOCl_2 . Выход 3.6 г (92%); т.пл. 115 °С. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0.92 (т, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $J=7.35$ Гц); 1.37 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1.43 (с, 18H, ^tBu); 2.0 (с, 3H, COCH_3); 3.04 (д.д. 1H, $\text{CH}-\text{HCH}$, $J=5.2$ Гц; $J_{\text{gem}}=6.1$ Гц); 3.06 (д.д. 1H, $\text{CH}-\text{HCH}$, $J=6.6$ Гц; $J_{\text{gem}}=6.1$ Гц); 4.07 (м, 2H, OCH_2); 4.85 (м, 1H, CH); 5.13 (с, 1H, OH); 5.91 (д, 1H, NH $J=7.6$ Гц); 6.80 (с, 2H, Ar); ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3367 (NHCO); 3187 уш.(OH); 2960 (CH); 1739 (COO-); 1649 (CONH); 1213 (C-O-C). Найдено %: C 70.68; H 9.42; N 3.47. $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{NO}_4$. Вычислено %: C 70.55; H 9.52; N 3.58

н-Нониловый эфир 2-(N-метиламид)- 3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)пропионовой кислоты (6) получили путем прибавления 5 мл SOCl_2 к раствору 3.35 г (0.01 моль) соединения **1** и 0.1 мл н-нонилового спирта в 15 мл Bu^tOH в течение 30 мин. при 20 °С Через 6 ч растворитель отделили, остаток кристаллизовали из ацетона. Выход 4.2 г (91%), т.пл. 104-106 °С.

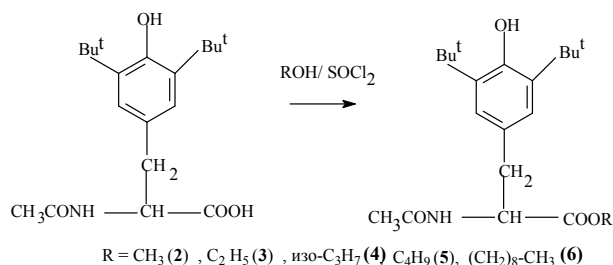
Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 0.90 (т, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $J=6.71$ Гц); 1.28 (м, 14H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1.43 (с, 18H, ^tBu); 2.01 (с, 3H, COCH_3); 3.06 (д.д., 1H, HCHAr , $J=4.75$ Гц, $J_{\text{gem}}=4.85$ Гц); 3.08 (д.д., 1H, HCHAr , $J=3.95$ Гц, $J_{\text{gem}}=4.85$ Гц); 4.11 (м, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2$); 4.85 (м, 1H, CH); 5.13 (с, 1H, OH); 5.93 (с уш., 1H, NH); 6.89 (с, 2H, Ar); ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3351 (NHCO); 3169 уш.(OH); 2958 (CH); 1720 (COO-); 1645 (CONH); 1252 (C-O-C). Найдено %: C 72.78; H 10.34; N 3.07. $\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{NO}_4$. Вычислено %: C 72.84; H 10.26; N 3.03

Метилловый эфир 3-(3',5'-ди-трет.бутил-4'-гидроксифенил)пропановой кислоты (7). К

раствору 4.88 г (0.01 моля) 2,6-ди-трет.бутилфенолята калия в 4 мл ДМСО при 115 °С прибавили 2.5 мл (0.03 моля) метилакрилата. Через 3 ч после охлаждения нейтрализовали 10% HCl и после кристаллизации из гексана получили 5.16 г (88%) соединения **1**, т.пл. 66 °С (ср. лит.[9] 66 °С).

Обсуждение результатов

Наиболее перспективным является метод этерификации в растворе первичных спиртов (метанол, этанол, бутанол) в условиях катализа SOCl_2 . Выход сложных эфиров до 98%. Реакция этерификации протекает в изопропиловом спирте. В растворе Bu^tOH соединение **1** с SOCl_2 не взаимодействует. Это свойство использовано для препаративного синтеза сложных эфиров из высших спиртов (н-нониловый спирт) (схема 1). В присутствии минеральных кислот (HCl, H_2SO_4) образуются продукты дезалкилирования, что соответствует литературным данным [10].



Строение полученных соединений **2-6** подтверждено данными ЯМР ^1H спектрами. Идентификация сигналов от протонов групп CH_2 в соединении **5** выполнена в режиме сосу Н-Н. В ИК спектрах, полученных методом отражения в твердой фазе, частота фенольного гидроксила находится в области 3100 см^{-1} , что может быть следствием межмолекулярного взаимодействия протона гидроксильной группы с функциональным заместителем. Аналогичный эффект рассмотрен в работе [11].

Период торможения окисления с участием антиоксиданта (τ) и коэффициент обрыва цепи (f) при постоянной скорости иницирования ($W_i=1.5 \cdot 10^{-8}$ моль $\cdot$ л $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$) определяли газометрическим методом [12]. Указанные параметры связаны выражением: $f=\tau W_i \cdot [\text{InH}]^{-1}$, где InH – соединения **2-7**. Величину константы скорости реакции (k_7) определяли из зависимости $\Delta[\text{O}_2]/[\text{RH}] = -k_2/k_7 \cdot \ln(1-t/\tau)$, где k_2 – константа скорости $\text{ROO}^\cdot$ с кумолом ($k_2 = 1.75$ л $\cdot$ моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$), $[\text{RH}]$ – концентрация кумола (7.18 моль $\cdot$ л $^{-1}$), $\Delta[\text{O}_2]$ – количество поглощенного кислорода (рис.1).

Результаты измерений кинетики поглощения кислорода от природы антиоксиданта указывают на зависимость от структуры, что выражается как в характере изменения поглощения кислорода, так и в величине коэффициента обрыва цепи. Из результатов сравнения зависимостей поглощения кислорода в присутствии антиоксидантов **2** и **7** следует, что соединение **2** ($k_7 = 2 \cdot 10^6$ л $\cdot$ моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$) обладает более высокими антиокислительными свойствами по сравнению с **7** ($k_7=2 \cdot 10^4$ л $\cdot$ моль $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$). Результаты вычислений констант реакций пероксильного ради-

кала кумола с соединениями 2-6 и величины коэффициентов обрыва цепи представлены в табл. 1.

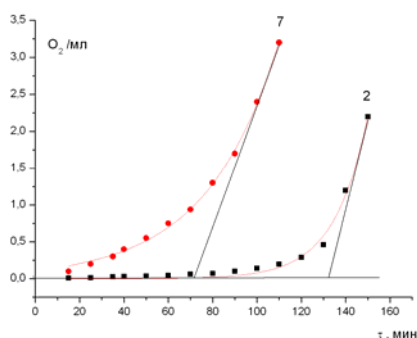


Рис. 1 - Кинетические зависимости поглощения кислорода в реакции инициированного окисления кумола при 50 °С в присутствии соединений 2, 7 и азодиизобутиронитрила; $W_i = 1.5 \cdot 10^{-8}$ моль·л⁻¹·с⁻¹; $[2]_0 = 3.1 \cdot 10^{-5}$; $[7]_0 = 3.6 \cdot 10^{-5}$ моль·л⁻¹

Таблица 1 - Константы реакций пероксильного радикала кумола с антиоксидантами 2-6 и величины коэффициентов обрыва цепи.

Соединение	f	$k_7 \cdot 10^6$ л·моль ⁻¹ ·с ⁻¹
2	2	2±0.2
3	2	2±0.2
4	1	1±0.1
5	2	2±0.2
6	2	1±0.1

Алкильные заместители в структурах фенолов 2-6 оказывают влияние на величины k_7 и параметры f, однако это влияние несущественно по сравнению с аналогичными параметрами эффективности соединения 2.

Обнаруженную зависимость изменения антиокислительных свойств в полученных соединениях по сравнению с ранее известными производными пространственно-затрудненных фенолов нельзя объяснить в рамках теории гомолиза НО-связи.

Результаты расчетов структур соединений 2 и 7 квантово-химическим методом указывают, что в этих соединениях величины энергии гомолиза ($D_{(OH)}$) достаточно близки (таблица 2), тогда как геометрии их молекул различны.

Таблица 2 - Энергетические параметры соединений 2 и 7 по данным расчета структур методом Хартри-Фока с параметром RHF

	$-E_{InH}^0 / E_{In}^0$ кДж·моль ⁻¹	H^0 кДж·моль ⁻¹	S^0 Дж·К ⁻¹ ·моль ⁻¹	E_{total} кДж·моль ⁻¹	$D_{(OH)}$ кДж·моль ⁻¹
2a	871/741	81.6	837	70.3	349.4
2б	846/712	80.3	807	84.5	354.0
7	667/536	67.7	711	87.8	348.5

Расчет $D_{(OH)}$ основан на энергиях образования фенола ($-E_{f_{InH}}^0$), соответствующего феноксильного радикала $-E_{f_{(In)}}^0$ и атома водорода и выражается соотношением [13]:

$$D_{(OH)} = -E_{f_{(In)}}^0 + E_{f_{(H)}}^0 - (-E_{f_{InH}}^0); \quad E_{f_{(H)}}^0 = 218.0 \text{ кДж·моль}^{-1} (\sim 52.1 \text{ ккал·моль}^{-1})$$

В приближении РМ6 были рассчитаны две структуры 2a и 2б с минимумами энергий образования $E^0 = 871$ и $E^0 = 846$ кДж·моль⁻¹ (рис.2)

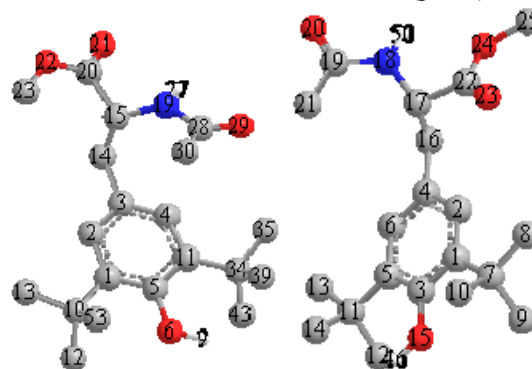


Рис. 2 - Ротомеры (2a и 2б) соединения 2

Геометрии этих структур соответствуют двум ротомерам, отличающимся по энтропии ($S^0 = 807$ и 837 энтр.ед.), свободной энергии (E_{total}) и энергии гомолиза НО связи $D_{(OH)}$ в молекуле антиоксиданта.

Известно [14], что геометрические параметры и энтропия соединения взаимосвязаны и, следовательно, энтропия может влиять на антиокислительные свойства, через изменения свободной энергии соединения. Следствием такого изменения появляются области с повышенной электронной плотностью, что ведет к взаимному отталкиванию электронов (steric effect).

В исследованиях с использованием эритроцитов и синтезированных антиоксидантов установлено, что эти соединения вступают во взаимодействие с клеточной мембраной и интеркалируются во внутримембранное пространство клетки. Выявлено влияние структуры алкильного заместителя на процесс интеркаляции. Полученные данные указывают на распределение наиболее гидрофобных компонентов молекул антиоксидантов во внутреннем монослое эритроцитарной мембраны, где они проявляют антиокислительные действия.

Таким образом, можно предположить, что свойства эфиров 2-(N-метиламид)-3-(3',5'-дипроп.бутил-4'-гидроксифенил)пропионовых кислот связаны с геометрией связей между ядрами атомов в молекуле и возможностью перехода электрона с ВЗМО антиоксиданта на низшую свободную орбиталь (НСМО) пероксильного радикала.

Литература

- О.И.Дюбченко, В.В.Никулина, Е.И.Терах, А.Е.Просенко, И.А.Григорьев, Изв.РАН, Сер.хим., 1107 (2007)
- А.Е.Просенко, А.А.Скоробогатов, О.И.Дюбченко, П.И.Пинко, Н.В.Кандалинцева, М.М.Шакиров, Л.М.Покровский, Изв.РАН, Сер.хим. 2007, 1078 (2007)
- Н.М.Сторожок, М.Г.Перевизкина, Г.А.Никифоров Изв.РАН, Сер.хим. 2005, 323 (2005)

4. Д.В.Арефев, И.С.Белостоцкая, В.Б.Вольева, Н.С.Домина, Н.Л.Комиссарова, О.Ю.Сергеева, Р.С.Хрусталева Изв.РАН, Сер.хим. , 751 (2007)
5. В.Ф. Цепалов, «Исследование синтетических и природных антиоксидантов in vivo и in vitro» Москва, Наука, , 16 (1992)
6. А.А. Володькин, Г. Е. Заиков, Н.М.Евтеева Изв.РАН, Сер.хим., 900 (2009)
7. Е.Ю.Паршина, Л.Я.Гендель, Ф.В.Рубан, Биофизика, **49**, 1094 (2004)
8. J.J.P. Stewart, J.Mol.Mod. **13**, 1173 (2007)
9. А.А.Володькин, Г.Е.Заиков, Изв. АН, Сер. хим., 2031 (2002)
10. А.Е.Просенко, А.А.Скоробогатов, О.И.Дюбченко, П.И.Пинко, Н.В.Кандалицева, М.М.Шакиров, Л.М.Покровский, Изв.РАН, Сер.хим., 1078 (2007)
11. J.Huang, Sh.Chen, A.Guzel, L.Yu, J.Amer. Chem. Soc., **128**, 11985 (2006)
12. Н.М.Эмануэль, Е.Т.Денисов, З.К.Майзус, «Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе» Москва, Наука, 37 (1965)
13. С.Л.Хурсан Гомодесмический метод определения термодинамических характеристик органических соединений. Окисление, окислительный стресс и антиоксиданты, Москва, 195 (2010)
14. Л.А. Грибов. Элементы квантовой теории строения и свойств молекул, Москва, Интеллект, 284 (2010)

© **А. А. Володькин** – д-р хим. наук, проф. вед. науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН; **Г. Е. Заиков** - д-р хим. наук, гл. науч. сотр., проф. Института биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН, chembio@sky.chph.ras.ru; **Л. Н. Курковская** – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН; **Н. М. Евтеева** - канд. хим. наук, ст. науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН; **С. М. Ломакин** – канд. хим. наук, зав. лаб. Института биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН; **Е. Ю. Паршна** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. каф. биофизики биофака МГУ им. М.В.Ломоносова; **Л. Я. Гендель** – д-р биол. наук, зав. лаб. каф. биофизики биофака МГУ им. М.В.Ломоносова; **З. М. Рахбанова** – стажер каф. биофизики биофака МГУ им. М.В.Ломоносова; **А. Ф. Яруллин** – ассистент каф. технологии полимерных материалов КНИТУ.