

УДК 54-483:54-112

## ПЕРЕКРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ЭКСТРАКТОВ БЕТУЛИНА ИЗ ВЫСОКОКИПАЮЩИХ УГЛЕВОДОРОДНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

© В.В. Жук<sup>1,3\*</sup>, В.А. Яновский<sup>1,3</sup>, Е.А. Яновская<sup>2</sup>, А.А. Бакибаев<sup>3</sup>, О.С. Андриенко<sup>1</sup>, Ш.М. Шарифеев<sup>3</sup>, В.И. Сачков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Сибирский физико-технический институт им. акад. В.Д. Кузнецова  
Томского государственного университета, пл. Новособорная, 1, Томск,  
634050 (Россия), e-mail: vvzh@tpu.ru

<sup>2</sup>НИИ фармакологии СО РАМН, пр. Ленина, 3, Томск, 634028 (Россия),  
e-mail: yale3@yandex.ru

<sup>3</sup>Томский национальный исследовательский политехнический университет,  
пр. Ленина, 30, Томск, 634050 (Россия), e-mail: bakibaev@mail.ru

Статья посвящена исследованию перекристаллизации суммарного этанольного экстракта бересты березы повислой (*Betula pendula* Roth). Установлено, что наилучший результат достигается при использовании в качестве растворителей высококипящих алифатических углеводородов, не содержащих ароматических компонентов. Показано, что данный способ является удобным для очистки бетулина от сопутствующих примесей и позволяет получать бетулин, пригодный для дальнейшего использования в органическом синтезе без дополнительной очистки.

*Ключевые слова:* *Betula pendula* Roth, бетулин, алифатические высококипящие углеводороды, перекристаллизация.

*Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 гг.»*

### Введение

Бетулин (3β,28-дигидрокси-20(29)-лупен) является тритерпеноидом лупанового ряда. Основной источник бетулина – внешний слой коры (береста) некоторых видов берез, где его содержание может достигать 30–35% [1–3].

Неуклонно растущий интерес к бетулину и его производным обусловлен, прежде всего, очень широким спектром биологической активности этих соединений [4].

*Жук Владислав Витальевич* – младший научный сотрудник, e-mail: vvzh@tpu.ru

*Яновский Вячеслав Александрович* – старший научный сотрудник, кандидат химических наук, e-mail: vvzh@tpu.ru

*Яновская Елена Анатольевна* – младший научный сотрудник, e-mail: yale3@yandex.ru

*Бакибаев Абдигали Абдимананович* – заведующий кафедрой физической и аналитической химии, доктор химических наук, профессор, e-mail: bakibaev@mail.ru

*Андриенко Олег Семенович* – старший научный сотрудник, кандидат химических наук, e-mail: aos@iao.ru

*Шарифеев Шариф Мнирович* – студент, e-mail: ShShMn1994@vtomske.ru

*Сачков Виктор Иванович* – заведующий лабораторией, кандидат химических наук, доцент, e-mail: vicsachkov@ngs.ru

Доказано, что бетулин и ряд его производных обладают антисептической, антиоксидантной, противовоспалительной, противоопухолевой, гепатопротекторной и другими видами биологической активности [4–7]. В настоящее время ведутся интенсивные поиски новых антибактериальных и противовирусных препаратов на основе бетулина, в том числе обладающих анти-ВИЧ-активностью [4, 8, 9]. Экстракты, содержащие бетулин, нашли широкое применение в косметологии и фармакологии.

Очевидно, что подобные исследования диктуют потребность в соответствующих методах получения исходного бетулина в достаточных количествах,

\* Автор, с которым следует вести переписку.

а также в простых способах очистки его от сопутствующих минорных примесей. Большинство известных способов выделения бетулина основано на методах экстракции бересты различными растворителями [10–12]. При этом получаемый экстракт содержит, как правило, помимо бетулина, значительные количества других соединений, таких как лупеол, бетулиновый альдегид, лупеоловый альдегид, пальмитиновую кислоту [13, 14] и нуждается в дополнительной очистке от них.

В настоящее время доступные сведения об очистке бетулина от примесей носят бессистемный характер и в большинстве своем представляют способы, основанные на перекристаллизации бетулина из полярных протонных и апротонных растворителей. Известно [15], что использование для перекристаллизации таких растворителей, как низшие алифатические спирты, хлороформ, ацетон, этилацетат, дихлорметан, приводит к образованию сольватных комплексов с бетулином, что затрудняет его идентификацию как индивидуального соединения. Кроме того, необходимо отметить малую селективность этих растворителей, относительно сопутствующих бетулину примесей, таких как лупеол, полифенолы и окисленные формы бетулина, которые также растворимы в данных растворителях и ухудшают качество получаемого бетулина. Например, при использовании этанола в качестве растворителя для перекристаллизации наблюдаются существенные потери бетулина (до 40%), остающегося в растворенном виде в маточном растворе, что связано с узким интервалом изменения растворимости бетулина в зависимости от температуры. Так для 86%-ного этанола содержание бетулина при температуре кипения составляет 5,35%, а при 8 °С – 1,86% (т.е. потери бетулина в маточном растворе в этом случае достигают 34,8%) [16].

В связи с этим целью данной работы был поиск сравнительно простого метода, обеспечивающего получение бетулина высокой степени чистоты, пригодного для дальнейшего использования в органическом синтезе без дополнительной очистки; и минимизации потерь бетулина.

### **Экспериментальная часть**

Суммарный экстракт, содержащий бетулин, получали тонкопленочной парофазной экстракцией бересты березы повислой (*Betula Pendula* Roth) этанолом по предложенному нами ранее методу [11, 17]. Для перекристаллизации использовали: *n*-октан, *n*-нонан, *n*-декан, *n*-ундекан – коммерчески доступные, квалификации «х.ч.», без дополнительной очистки. Нефрас С4-150/200 и керосин ТС-1 предварительно перегоняли для отделения нелетучих тяжелых примесей и собирали фракции с температурами выкипания в интервале 150–200 °С.

Перекристаллизацию проводили дважды. В стакан помещали суммарный спиртовый экстракт березовой коры, содержащий бетулин, и выбранный растворитель из расчета 25 мл растворителя на 1 г сухого экстракта, суспензию нагревали до кипения и кипятили при перемешивании до тех пор, пока раствор не становился прозрачным, при этом на дне стакана оставались нерастворимые примеси. Затем содержимое стакана подвергали горячему фильтрованию, нерастворимые примеси отделяли, на фильтре промывали гексаном и сушили в вакууме при температуре 50 °С. Фильтрат охлаждали до температуры 0 °С, при этом выпадал осадок бетулина, который отфильтровывали, промывали на фильтре гексаном и сушили в вакууме при температуре 50 °С. Высушенный бетулин и фракцию нерастворимых примесей взвешивали. Растворитель отгоняли в вакууме водоструйного насоса досуха и взвешивали сухой кубовый остаток для учета потерь бетулина, оставшегося в маточном растворе.

Высушенный перекристаллизованный бетулин подвергали повторной перекристаллизации по той же методике.

Потери продукта определялись в пересчете на чистый бетулин.

Анализ полученных продуктов осуществляли методом ВЭЖХ, на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милюхром А-02» с УФ-детектором и колонкой размером 2×75 мм, заполненной сорбентом ProntoSIL – 120-5-C18 AQ по известной методике. Элюирование проводили подвижной фазой ацетонитрил – вода в соотношении 80 : 20, в изократическом режиме при температуре колонки 35 °С и скорости расхода элюента 100 мкл/мин. Детектирование проводили при длине волны 210 нм в соответствии с максимумом поглощения бетулина. Для приготовления элюентов использовали ацетонитрил (сорт 1) фирмы «Криохром» (Санкт-Петербург) и дистиллированную воду, очищенную с помощью системы Milli-Q (Millipore, США). Исследуемые образцы бетулина растворяли в смеси ацетон – ацетонитрил в соотношении 40 : 60. Объем аликвоты составлял 5 мкл.

Количественное содержание бетулина определяли методом абсолютной калибровки. Калибровочный график описывается линейной функцией  $C = 0,0924 \cdot S$ , где  $S$  – площадь хроматографического пика и  $C$  – концентрация бетулина в растворе (мг/мл). Значение коэффициента корреляции составило 0,997.

Спектры ЯМР регистрировались на спектрометре Bruker Avance AV-300 при частоте 300 МГц ( $^1\text{H}$ ) по стандартной методике, растворитель –  $\text{CDCl}_3$ .

### Результаты и обсуждение

Содержание бетулина в исходных образцах определялось хроматографическими методами и составляло 72,5%.

Нами было показано, что после первой перекристаллизации получаемые образцы содержат 84,6–95,4% бетулина. После второй перекристаллизации содержание бетулина составляет 88,2–98,3% (табл.).

Установлено, что оптимальными растворителями для перекристаллизации являются нонан (температура перекристаллизации 150 °С) и декан (температура перекристаллизации 174 °С). При использовании более низкокипящих растворителей, таких как октан (температура перекристаллизации 125 °С), снижается выход бетулина, при этом значительное его количество остается во фракции нерастворимых примесей. Это связано с тем, что растворимость бетулина в углеводородных растворителях в значительной мере зависит от температуры и уменьшается при ее понижении. Таким образом, при температурах проведения процесса очистки ниже 150 °С необходимо увеличивать количество растворителя для полного растворения бетулина, при этом возрастают потери в маточном растворе. При перекристаллизации из более высококипящих растворителей, таких как ундекан (температура перекристаллизации 195 °С), снижается качество получаемого бетулина, связанное с его частичным осмолением. Установлено, что оптимальным является использование растворителей, позволяющих проводить процесс перекристаллизации в диапазоне температур 150–180 °С, в этом случае практически не наблюдается термодеструкции, бетулин количественно переходит в жидкую фазу, а при охлаждении количественно выпадает в осадок. При этом потери бетулина в маточнике составляют 1,6–1,8%.

Было обнаружено, что использование углеводородных растворителей, содержащих ароматические компоненты, таких как керосин и нефрас, ведет к уменьшению выхода бетулина (74,0–75,1%) и к снижению его чистоты (85,4–84,6%). Это связано с тем, что растворимость бетулина в ароматических растворителях выше, чем в алифатических, также фракция примесей, нерастворимая в алифатических углеводородах, частично растворяется в ароматических растворителях, загрязняя получаемый продукт.

На рисунке 1 представлена хроматограмма образца бетулина, полученного путем двойной перекристаллизации из нонана. Пик 4 соответствует бетулину, пики 1–3 – не идентифицированные соединения.

Затем этот же образец был проанализирован методом ЯМР. На рисунке 2 представлен спектр ЯМР  $^1\text{H}$  данного образца бетулина. Анализируя приведенный  $^1\text{H}$ -спектр, можно заключить, что он соответствует характеристическому спектру бетулина. Так, дублет при 4,62 м.д. соответствует винильным протонам  $\text{C}^{29}\text{H}_2$ . Дублет дублетов 3,52 м.д. – протонам  $\text{C}^{28}\text{H}_2$ . Мультиплет 3,2 м.д. – протону  $\text{C}^3\text{H}$ . Мультиплет 2,37 м.д. – протону  $\text{C}^{19}\text{H}$ . Таким образом, путем анализа приведенного  $^1\text{H}$ -спектра можно идентифицировать полученное соединение как бетулин.

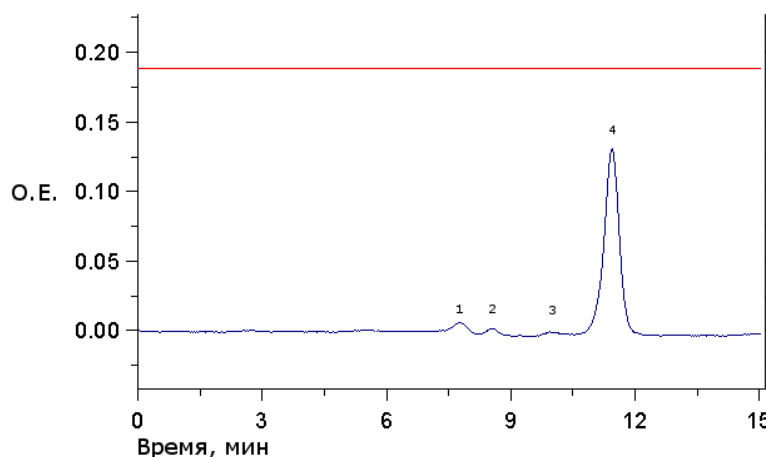
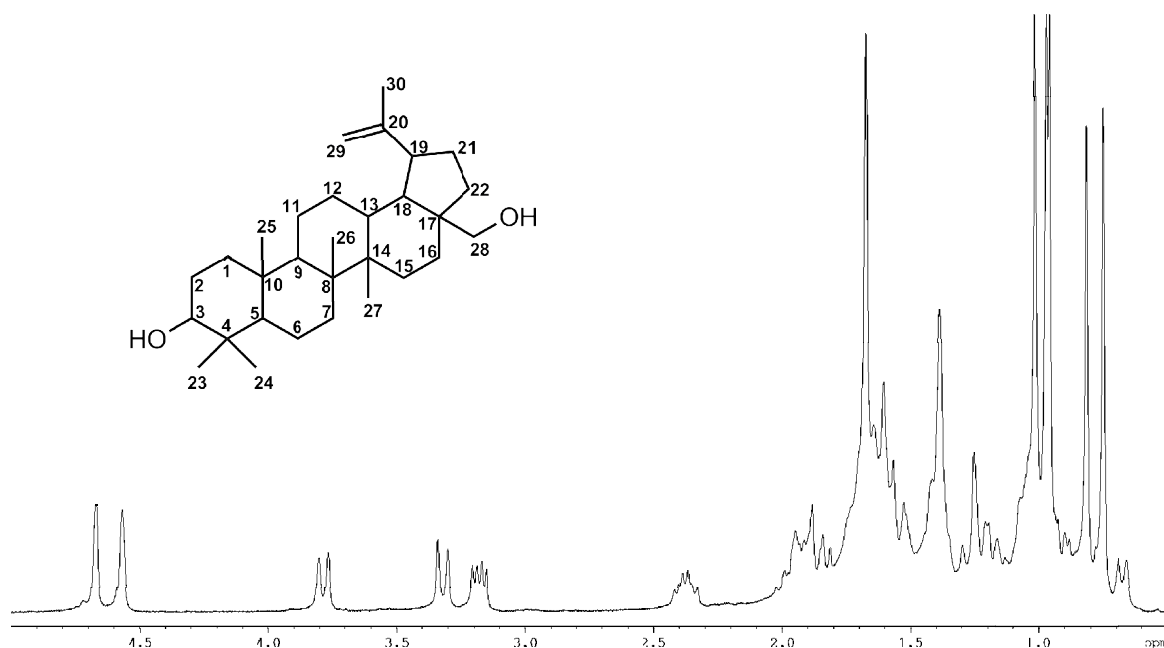


Рис. 1. Хроматограмма бетулина

Рис. 2.  $^1\text{H}$ -спектр бетулина

Кроме того, соотношение сигналов протонов в спектрах ЯМР полученных образцов строго соответствует структуре бетулина, что свидетельствует о том, что использование алифатических углеводородных растворителей, в отличие от низших алифатических спиртов, хлороформа, ацетона, этилацетата, дихлорметана [15], позволяет избежать образования сольватных комплексов.

Для проверки этого утверждения полученные образцы бетулина промывались гексаном и высушивались при комнатной температуре без вакуума. После каждого часа сушки образцы взвешивались. По достижении постоянной массы регистрировались ЯМР-спектры образцов. При этом в полученных ЯМР-спектрах не было зафиксировано сигналов, не соответствующих бетулину, что позволяет судить об отсутствии образования сольватных комплексов.

#### Характеристики полученных образцов бетулина

Растворитель	Температура процесса экстракции, °С	Первая перекристаллизация			Вторая перекристаллизация		
		Выход фракции бетулина, %	Содержание бетулина, %	Потери бетулина, %	Выход фракции бетулина, %	Содержание бетулина, %	Потери бетулина, %
<i>n</i> -октан	125	74,5	86,2	11,4	86,5	92,0	7,4
<i>n</i> -нонан	150	76,5	94,1	1,6	94,6	97,1	2,4
<i>n</i> -декан	174	75,2	95,4	1,8	95,5	98,3	1,3
<i>n</i> -ундекан	195	75,3	91,2	5,2	90,1	94,1	6,8
Нефрас	155	74,0	85,4	12,8	84,3	89,5	11,4
C4-150/200							
Керосин ТС-1	150	75,1	84,6	12,4	85,6	88,2	10,7

#### Выводы

В работе было исследована перекристаллизация суммарного этанольного экстракта бетулина из высококипящих алифатических углеводородов. Показано, что данный способ является удобным для очистки бетулина от сопутствующих примесей и позволяет получать бетулин, содержащий до 98% основного вещества, пригодный для дальнейшего использования в органическом синтезе без дополнительной очистки. При этом потери бетулина при перекристаллизации составляют 1,6–1,8%.

Установлено, что наилучший результат достигается при использовании высококипящих алифатических углеводородных растворителей, таких как *n*-нонан и *n*-декан. Было обнаружено, что присутствие ароматических компонентов в растворителе снижает чистоту получаемого продукта и его выход.

### Список литературы

1. Hayek E.W.H., Jordis U., Moche W., Sauter F. A bicentennial of betulin // *Phytochemistry*. 1989. Vol. 28. Pp. 2229–2242.
2. Cinta Pinzaru S., Leopold N., Kieper W. Vibrational spectroscopy of betulinic acid HIV inhibitor and of its birch bark natural source // *Talanta*. 2002. Vol. 57, N4. Pp. 625–631.
3. Похило Н.Д., Уварова Н.И. Изопреноиды различных видов рода *Betula* // *Химия природных соединений*. 1988. №3. С. 325–341.
4. Толстикова Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э. и др. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2005. №13. С. 1–31.
5. Matsuda H., Ishikado A., Nishida N. Hepatoprotective, superoxide scavenging and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica* // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*. 1998. Vol. 8. Pp. 2939–2944.
6. Urban M., Sarek J., Klinot J., Korinkova G., Hajduch M. Synthesis of A-Seco Derivatives of Betulinic Acid with Cytotoxic Activity // *Journal of Natural Products*. 2004. Vol. 67. Pp. 1100–1105.
7. Кузнецова С.А., Титова Н.М., Калачева Г.С., Зайбель И.А. Изучение состава и антиоксидантных свойств гексанового и этанольного экстрактов бересты // *Вестник Красноярского государственного университета. Естественные науки*. 2005. №2. С. 113–118.
8. Pavlova N.I., Savinova O.V., Nikolaeva S.N. et. al. Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and nonenveloped viruses // *Foroterapia*. 2003. Vol. 74, N5. Pp. 489–492.
9. Evers M., Poujade C., Soler F. et. al. Betulinic Acid Derivatives: A New Class of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Specific Inhibitors with a New Mode of Action // *J. Med. Chem*. 1996. Vol. 39. Pp. 1056–1068.
10. Левданский В.А., Полежаева Н.И., Кузнецов Б.Н. Экстракционная переработка коры березы без ее предварительного разделения на бересту и луб // *Вестник Красноярского государственного университета*. 2004. № 2. С. 68–73.
11. Патент №2298558 (РФ). Способ получения экстрактивных веществ из бересты березы / А.А. Бакибаев, В.В. Жук, Д.М. Медведев, А.Ю. Яговкин, В.А. Яновский // 10.05.2007. БИ. №13. 5 с.
12. Патент №2206572 (РФ). Способ выделения бетулинола / М.С. Борц, Е.Г. Николаева, И.С. Лаевский // 20.06.2003, БИ. №13. 6 с.
13. Кузнецова С.А., Скворцова Г.П., Калачева Г.С., Зайбель И.А., Ханчич О.А. Изучение состава этанольного экстракта бересты и его токсико-фармакологических свойств // *Химия растительного сырья*. 2010. №1. С. 137–141.
14. Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Веселова О.Ф., Кукина Т.П., Скворцова Г.П., Калачева Г.С. Изучение состава гексанового экстракта бересты и его токсико-фармакологических свойств // *Химия растительного сырья*. 2008. №1. С. 45–49.
15. Михайленко М.А., Шахтшнейдер Т.П., Брезгунова М.Е., Дребущак В.А., Кузнецова С.А., Болдырев В.В. Получение и исследование физико-химических свойств сольватов бетулина // *Химия растительного сырья*. 2010. №2. С. 63–70.
16. Селянина Л.И. Выделение бетулина из отходов переработки березы экстракцией спиртом // *Известия вузов. Лесной журнал*. 2004. №6. С. 47–49.
17. Жук В.В., Бакибаев А.А., Яновский В.А., Медведев Д.М., Яговкин А.Ю. Исследование влияния природы экстрагентов в процессе тонкоплочной парофазной экстракции на состав, степень извлечения и форму получаемых продуктов // *Известия Томского политехнического университета*. 2007. Т. 311, №3. С. 99–101.

*Поступило в редакцию 7 февраля 2012 г.*

*После переработки 13 марта 2012 г.*

Zhuk V.V.<sup>1,3\*</sup>, Yanovskiy V.A.<sup>1,3</sup>, Yanovskaya E.A.<sup>2</sup>, Bakibaev A.A.<sup>3</sup>, Andrienko O.S.<sup>1</sup>, Sharafiev Sh.M.<sup>3</sup>, Sachkov V.I.<sup>1</sup>  
 RECRYSTALLIZATION OF BETULIN EXTRACTS FROM HIGH-BOILING HYDROCARBON SOLVENTS

<sup>1</sup>Siberian Physical-Technical Institute of Tomsk State University, pl. Novosobornaia, 1, Tomsk, 634050 (Russia),  
 e-mail: vvzh@tpu.ru

<sup>2</sup>Research institute of pharmacology Siberian department of RAMS, pr. Lenina, 3, Tomsk, 634028 (Russia),  
 e-mail: yale3@yandex.ru

<sup>3</sup>Tomsk polytechnic university, pr. Lenina, 30, Tomsk, 634050 (Russia), e-mail: bakibaev@mail.ru

In this investigation we studied recrystallization of betulin from total ethanol extract of the silver birch (*Betula pendula* Roth). The aim of this investigation was to develop a relatively simple method to obtain pure betulin suitable for using in organic synthesis without further purification.

Currently available information about purification the betulin from impurities is mainly the methods based on recrystallization of betulin from polar protic and aprotic solvents. As a rule, the use of solvents for recrystallization of solvents as lower aliphatic alcohols, chloroform, acetone, ethyl acetate, dichloromethane leads to the formation of solvate complexes with betulin. It should be noted low selectivity of these solvents with respect to the accompanying betulin impurities such as lupeol, polyphenols and oxidized forms of betulin. In addition, when we use these solvents for recrystallization of betulin losses can reach 40%.

We found that the use of high-boiling aliphatic hydrocarbon as solvents for the recrystallization of betulin allows obtaining betulin purity up to 98%. It was found that the presence of aromatic components in the composition of the solvent significantly reduces the purity and yield of obtained betulin. In this case the loss of betulin during recrystallization is about 2%.

Analysis of the samples was carried out <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and HPLC.

**Keywords:** *Betula pendula* Roth, betulin, high-boiling aliphatic hydrocarbons, the recrystallization.

### References

1. Hayek E.W.H., Jordis U., Moche W., Sauter F. *Phytochemistry*, 1989, vol. 28, pp. 2229–2242.
2. Cinta Pinzaru S., Leopold N., Kieper W. *Talanta*, 2002, vol. 57, no. 4, pp. 625–631.
3. Pokhilo N.D., Uvarova N.I. *Khimiia prirodnikh soedinenii*, 1988, no. 3, pp. 325–341. (in Russ.).
4. Tolstikov G.A., Flekhter O.B., Shul'ts E.E. etc. *Khimiia v interesakh ustoichivogo razvitiia*, 2005, no. 13, pp. 1–31. (in Russ.).
5. Matsuda N., Ishikado A., Nishida N. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*, 1998, vol. 8, pp. 2939–2944.
6. Urban M., Sarek J., Klinot J., Korinkova G., Hajduch M. *Journal of Natural Products*, 2004, vol. 67, pp. 1100–1105.
7. Kuznetsova S.A., Titova N.M., Kalacheva G.S., Zaibel' I.A. *Vestnik Krasnoarskogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennye nauki*, 2005, no. 2, pp. 113–118. (in Russ.).
8. Pavlova N.I., Savinova O.V., Nikolaeva S.N. et. al. *Foroterapia*, 2003, vol. 74, no. 5, pp. 489–492.
9. Evers M., Poujade C., Soler F. et. al. *J. Med. Chem.*, 1996, vol. 39, pp. 1056–1068.
10. Levdanski V.A., Polezhaeva N.I., Kuznetsov B.N. *Vestnik Krasnoarskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2004, no. 2, pp. 68–73. (in Russ.).
11. Patent 2298558 (Russia). A.A. Bakibaev, V.V. Zhuk, D.M. Medvedev, A.Iu. Iagovkin, V.A. Ianovskii. 2007. (in Russ.).
12. Patent 2206572 (Russia). M.S. Borts, E.G. Nikolaeva, I.S. Laevskii. 2003. (in Russ.).
13. Kuznetsova S.A., Skvortsova G.P., Kalacheva G.S., Zaibel' I.A., Khanchich O.A. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2010, no. 1, pp. 137–141. (in Russ.).
14. Kuznetsova S.A., Kuznetsov B.N., Veselova O.F., Kukina T.P., Skvortsova G.P., Kalacheva G.S. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2008, no. 1, pp. 45–49. (in Russ.).
15. Mikhailenko M.A., Shakhtshneider T.P., Brezgunova M.E., Drebuschak V.A., Kuznetsova S.A., Boldyrev V.V. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2010, no. 2, pp. 63–70. (in Russ.).
16. Selianina L.I. *Izvestiia vuzov. Lesnoi zhurnal*, 2004, no. 6, pp. 47–49. (in Russ.).
17. Zhuk V.V., Bakibaev A.A., Ianovskii V.A., Medvedev D.M., Iagovkin A.Iu. *Izvestiia Tomskogo politekhnicheskogo universiteta*, 2007, vol. 311, no. 3, pp. 99–101. (in Russ.).

Received February 7, 2011

Revised March 13, 2011

\* Corresponding author.