

УДК 634.085:582.632+547.914

## Разработка способа получения диацетата и дипропионата бетулина из коры березы

С. А. КУЗНЕЦОВА<sup>1,2</sup>, Б. Н. КУЗНЕЦОВ<sup>1,2</sup>, Г. П. СКВОРЦОВА<sup>1</sup>, Н. Ю. ВАСИЛЬЕВА<sup>2</sup>, Е. С. СКУРЫДИНА<sup>1</sup>, Г. С. КАЛАЧЕВА<sup>3</sup><sup>1</sup>Институт химии и химической технологии Сибирского отделения РАН,  
ул. К. Маркса, 42, Красноярск 660049 (Россия)E-mail: [ksa@icct.ru](mailto:ksa@icct.ru)<sup>2</sup>Сибирский федеральный университет,  
проспект Свободный, 79, Красноярск 660041 (Россия)<sup>3</sup>Институт биофизики Сибирского отделения РАН,  
Академгородок, Красноярск 660036 (Россия)

### Аннотация

Предложены способы синтеза диацетата и дипропионата бетулина из коры березы, основанные на совмещении стадии экстракции бетулина из бересты и его ацилирования уксусной и пропионовой кислотами. Структура полученных производных бетулина подтверждена методами хромато-масс-спектрометрии, FTIR- и ЯМР-спектроскопии.

**Ключевые слова:** кора березы, ацилирование, диацетат, дипропионат, бетулина, идентификация

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений утилизации отходов коры березы является ее экстрактивная переработка с получением ряда ценных химических веществ, из которых наиболее востребован бетулин. Бетулин и его производные проявляют высокую биологическую активность, и на их основе разрабатываются новые фармакологические препараты [1–5]. Диацетат бетулина обладает гиполипидемическим, желчегонным и антиоксидантным действием, служит сырьем для многих органических синтезов, таких как получение бетулиновой кислоты, серопроизводных бетулина, синтез аминопроизводных диацетата бетулина и др. [1, 6–8].

Способы синтеза эфиров бетулина, как правило, многостадийны и основаны на классических реакциях ацилирования бетулина, предварительно выделенного из коры березы [9, 10].

Характерная особенность строения бересты заключается в проявлении годичных слоев, которые состоят из рядов широких и узких клеток. Широкие клетки имеют тонкие стенки и заполнены бетулином. В процессе

роста дерева береста шелушится тонкими листочками, при этом внешний ряд тонкостенных клеток разрывается, и содержащийся в них бетулин высыпается наружу. Указанные особенности строения внешней коры березы были использованы нами для разработки новых способов синтеза диацильных производных бетулина, исключая стадию выделения бетулина из бересты.

Ранее мы предложили новый способ синтеза диацетата бетулина из коры березы, позволяющий совместить стадии экстракции бетулина и его ацетилирования [11]. Можно предположить, что аналогичным способом можно синтезировать и другие диацилаты бетулина, например пропионаты и бутираты бетулина. Целью данной работы было получение диацетата и дипропионата бетулина из коры березы и подбор условий синтеза, обеспечивающих наибольший выход продукта.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве сырья использовали бересту коры березы *Betula pendula* Roth., заготовлен-

ТАБЛИЦА 1

Химический состав исходной и автогидролизованной бересты березы, % от массы абсолютно сухой бересты

| Вещества        | Исходная | Автогидролизованная* |
|-----------------|----------|----------------------|
| Бетулин         | 44.6     | 38.8                 |
| Суберин         | 20.2     | 45.5                 |
| Целлюлоза       | 1.5      | 3.3                  |
| Лигнин          | 18.1     | 10.3                 |
| Зольные         | 0.3      | 0.3                  |
| Водорастворимые | 0.4      | 1.6                  |

\*После обработки паром при температуре 180 °С, давлении 3.4 МПа в течение 60 с.

ную в окрестностях Красноярска и измельченную до фракции 10–20 мм, и бересту, активированную в условиях взрывного автогидролиза.

Анализ химического состава бересты коры березы проведен по традиционным в химии древесины и по оригинальным методикам, описанным в работах [12–14].

Данные о химическом составе используемых образцов исходной и автогидролизованной бересты коры березы представлены в табл. 1.

Синтез диацилатов бетулина осуществляли обработкой образцов измельченной и фракционированной либо автогидролизованной и высушенной при температуре 105 °С до влажности менее 2 % бересты коры березы уксусной и пропионовой кислотами при температурах их кипения в круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником. После завершения реакции раствор концентрировали на роторном испарителе, остаток разбавляли пятикратным количеством воды. Выпавший осадок отфильтровывали, многократно промывали на фильтре дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Перекристаллизацию полученного продукта проводили из этанола с применением активированного угля марки ОУ-А (ГОСТ 4453–74). С целью интенсификации процесса ацетилирования бересты кипящей уксусной кислотой и увеличения выхода продуктов ацетилирования проведена активация бересты методом взрывного автогидролиза. Данный метод включает кратковременную обработку бересты насыщенным водяным паром при повышенной температуре и давлении с последующим резким сбросом давления. Эффективность активации растительного сырья методом взрывного авто-

гидролиза зависит от двух основных факторов: гидролиза слабых связей в растительных полимерах под воздействием органических кислот, образующихся при распаде гемицеллюлоз, и механического разрыхления сырья при резком сбросе давления. Такая активация может интенсифицировать и экстракцию бетулина из бересты [15–17].

Морфологию исходной и активированной бересты коры березы исследовали на сканирующем электронном микроскопе РЭМ 100 У в Центре коллективного пользования КНЦ СО РАН. На рис. 1 представлены электронно-микроскопические снимки исходной и активированной перегретым водяным паром бересты.

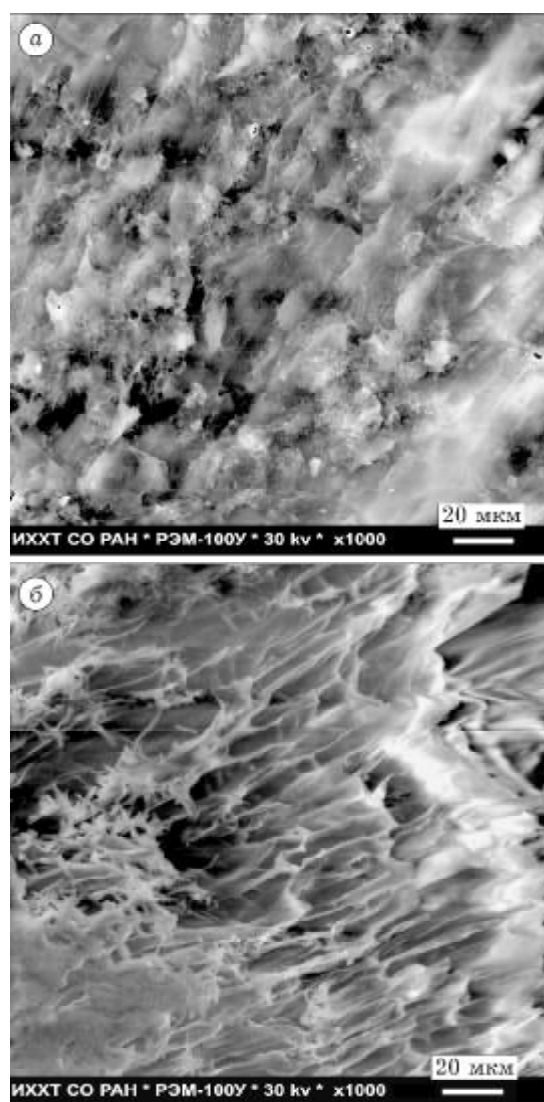


Рис. 1. Электронно-микроскопические снимки исходной (а) и активированной перегретым водяным паром (б) бересты коры березы. Ув. 1000.

Автогидролизованная береста имеет разрыхленную структуру, что облегчает транспорт реагентов в порах частицы бересты и диффузию в раствор продуктов реакции.

Анализ продуктов проводили на газовом хроматографе 6890N (Agilent, США) с пламенно-ионизационным детектором ГЖХ. Условия хроматографии: капиллярная колонка HP-5 длиной 30 м, внутренний диаметр 0.32 мм. Газ-носитель – азот; скорость потока 1.5 мл/мин; температура ввода проб 250 °С; начальная температура 180 °С, подъем температуры до 320 °С со скоростью 10 °С/мин, 10 мин изотермального режима. Идентификацию проводили по временам удерживания стандартов.

Для идентификации продуктов ацетилирования бересты проведен анализ на хромато-масс-спектрометре GCD Plus (Hewlett Packard, США) в Центре коллективного пользования КНЦ СО РАН (ХМС). Условия хроматографирования: температура ввода пробы 250 °С; скорость подъема температуры 5.0 °С/мин; скорость потока газа-носителя (гелия) через колонку 1.0 мл/мин; температура трансферной линии 250 °С, источника ионов – 165 °С, режим электронного удара при 70 эВ, режим сканирования фрагментов от 45 до 450

$m/z$  при 0.5 с/с. Применяли капиллярную колонку HP-5S длиной 30 м, диаметром 0.25 мм. Содержание компонентов определяли по данным о площадях газохроматографических пиков. Качественный анализ продуктов проводили путем сравнения данных о временах удерживания и полных масс-спектрах с соответствующими данными библиотеки масс-спектрометра.

На рис. 2 приведены ионные хроматограммы продуктов ацетилирования бересты уксусной кислотой, а на рис. 3 – масс-спектры лупеола, бетулина **I** и диацетата бетулина **II**. Установлено, что основными компонентами выделенных из бересты продуктов являются бетулин **I** и диацетат бетулина **II**. Кроме того, в небольших количествах присутствуют лупеол и ацетат лупеола. Идентификация бетулина **I** при сравнении с базой данных библиотеки масс-спектрометра проведена с хорошей вероятностью. Основной ион, совпадающий с его молекулярной массой, – это  $m/z$  442. Идентифицирующий фрагмент, образующийся при отщеплении спиртовой группы в положении 28, – фрагмент с  $m/z$  411. Кроме того, идентифицированы фрагменты с  $m/z$  69, 81, 95, 107, 189, 207, что указы-

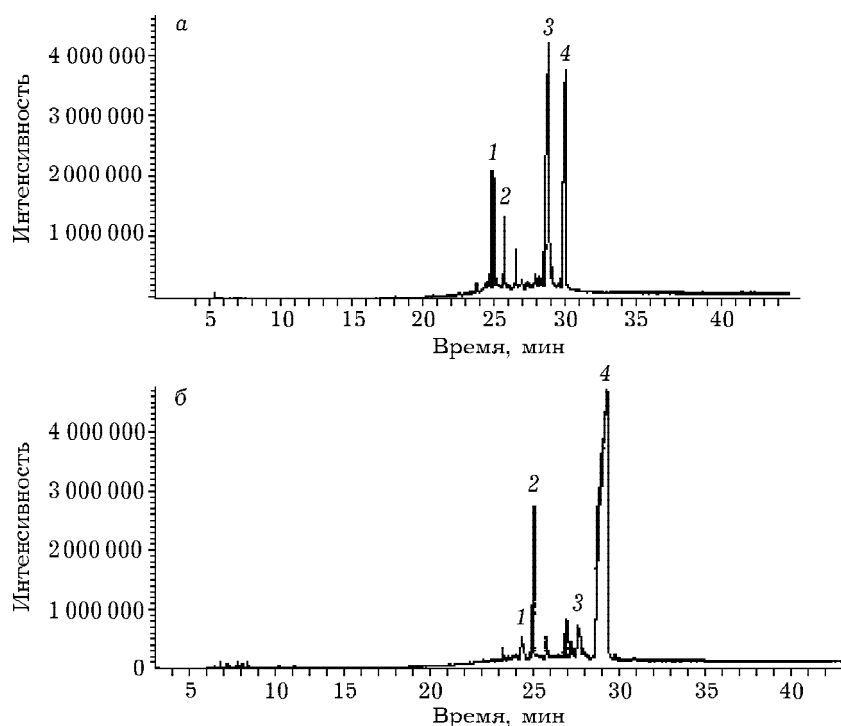


Рис. 2. Ионные хроматограммы продуктов ацетилирования бересты фракции 10–20 мм уксусной кислотой при продолжительности обработки 0.5 (а) и 18 ч (б): 1 – лупеол, 2 – ацетат лупеола, 3 – бетулин, 4 – диацетат бетулина.

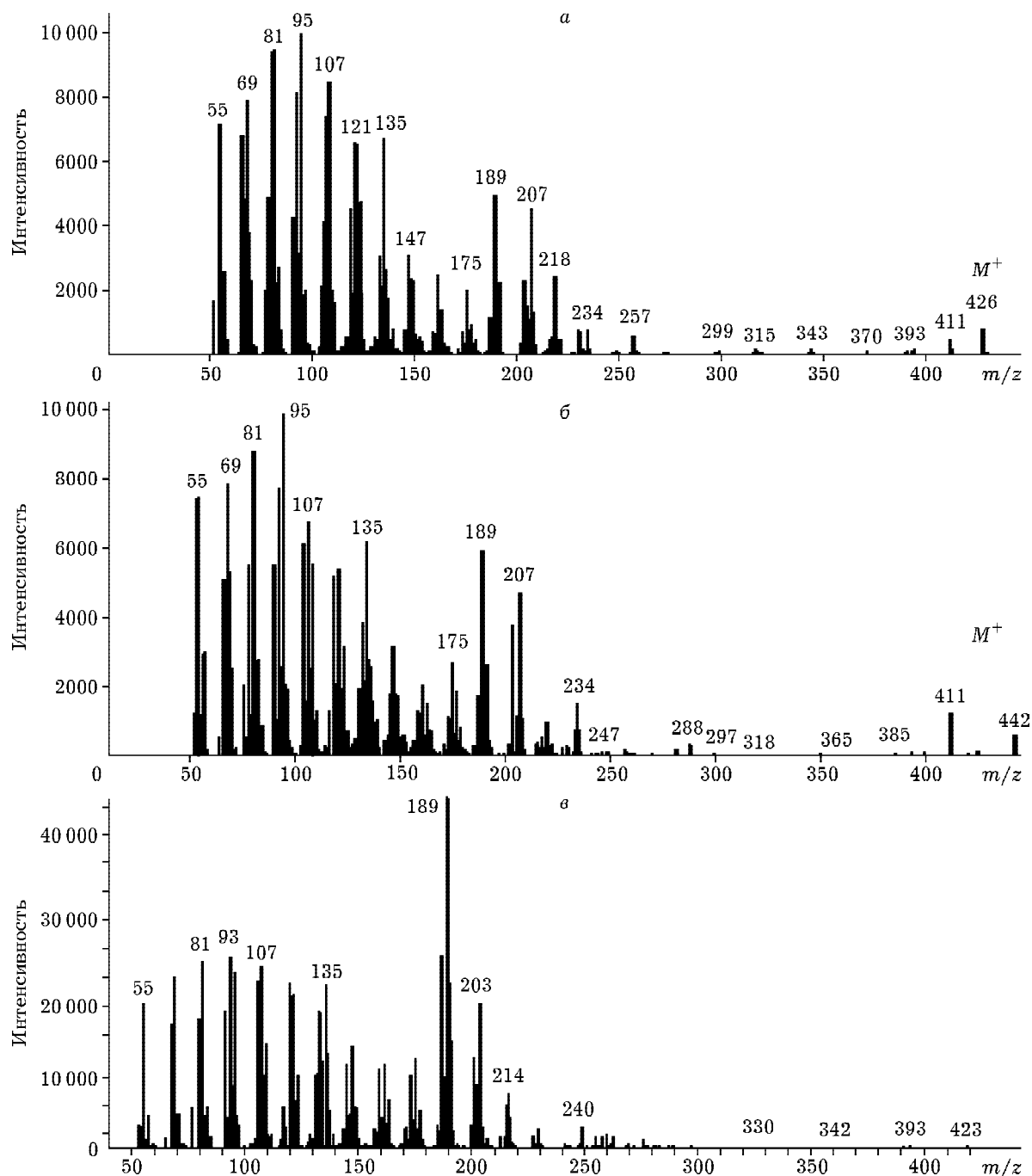


Рис. 3. Масс-спектры лупеола (а), бетулина (б), диацетата бетулина (в).

вает на принадлежность данного соединения к лупановому ряду. Другим идентифицированным соединением является лупеол ( $m/z$  426). Согласно полученным данным, перекристаллизованный из этилового спирта продукт ацетилирования бересты содержит 95.3 % диацетата бетулина II и 4.7 % ацетата лупеола.

Выделенный и перекристаллизованный из этилового спирта диацетат бетулина II [3 $\beta$ ,28-

ди-О-ацетил-луп-20(29)-лупен] имеет светлокремевый цвет, его чистота составляет 95 %, температура плавления – 222 °С.

Элементный анализ перекристаллизованных продуктов проводили с использованием элементного анализатора FLASH<sup>TM</sup> 1112. На основании данных элементного анализа диацетата бетулина II найдено, %: С 77.9, Н 10.2, О 11.9. Вычислено, %: С 77.6, Н 10.3, О 12.1.

Выделенный и перекристаллизованный из этилового спирта дипропионат бетулина **III** [3 $\beta$ ,28-ди-О-пропионил-луп-20(29)-лупена] имеет светло-желтый цвет, чистота его составляет 93 %, температура плавления – 150–152 °С. По данным элементного анализа дипропионата бетулина **III** найдено, %: С 80,0, Н 10,8, О 12,0. Вычислено, %: С 77,9, Н 10,5, О 11,6.

ИК-спектроскопическое исследование диацилатов бетулина выполнено на FTIR-Фурье-спектрометре Vector 22 (Bruker). Очищенные продукты прессовали с KBr в специальную матрицу. Обработку спектральной информации проводили с использованием программы OPUS/Y (версия 2.2).

В ИК-спектре диацетата бетулина **II** присутствуют следующие характеристические полосы поглощения (п.п.) ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3070,90 (=C–H), 1739,93 (C=O), 1649,86 (C=C), 1246,14, 1085,78 (C–O–C). ИК-спектр дипропионата бетулина **III** содержит характеристические п.п. ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3067,02 (=C–H), 1735,79 (C=O), 1641,88 (C=C), 1276,09, 1083,88 (C–O–C).

Спектры ПМР сняты в Центре коллективного пользования КНЦ СО РАН на спектрометре Bruker DPX-200 при частоте 200 МГц (= <sup>1</sup>H), растворитель – C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.

ПМР-спектр диацетата бетулина **II** совпадает с данными работы [7].

Спектр ЯМР-<sup>1</sup>H дипропионата бетулина **III** (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)  $\delta$ , м.д. ( $J$ , Гц): 4,83 (1H, м, =CH<sub>2</sub>); 4,74 (1H, м, =CH<sub>2</sub>); 4,72 (dd1H, H<sub>3</sub>); 4,53 (1H, d, H<sub>28</sub>); 4,0 (1H, d, C<sub>28</sub>H); 2,126 (2H, q, CH<sub>2</sub>, COCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2,124 (2H, q, CH<sub>2</sub>, COCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);

1,034 (3H, CH<sub>3</sub>, COCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,015 (3H, CH<sub>3</sub>, COCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1,676 (3H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>=CHCH<sub>3</sub>); 0,945, 0,938, 0,907, 0,900, 0,737 (15H, 5 CH<sub>3</sub>).

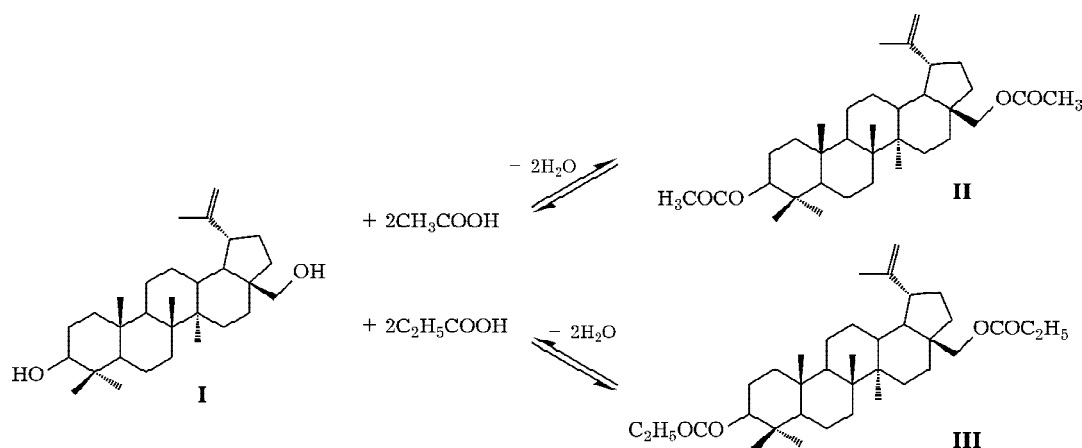
Выход продуктов ацетилирования уксусной кислотой неактивированной коры березы (фракция 10–20 мм) составил от 20 до 45 мас. % абсолютно сухой бересты (а. с. б.) при продолжительности ацетилирования от 0,5 до 18 ч. Максимальное содержание диацетата бетулина **II** в неперекристаллизованном продукте достигает 84 мас. %. При ацетилировании такой же фракции неактивированной коры березы пропионовой кислотой с той же продолжительностью процесса выход продуктов составил от 29 до 51 мас. % а. с. б. При этом максимальное содержание дипропионата бетулина **III** в неперекристаллизованном продукте составляет около 90 мас. %.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Влияние условий ацилирования бересты на выход экстрагируемых продуктов

При обработке бересты коры березы уксусной и пропионовой кислотами наряду с экстракцией бетулина в раствор протекает и реакция его ацилирования с получением диацетата (**II**) либо дипропионата (**III**) бетулина (схема 1).

Подбор оптимальных условий ацилирования бересты проводили варьированием величины гидромодуля (отношения жидкое/твердое) от 10 до 30 и продолжительности обработки кислотой от 0,5 до 18 ч. На рис. 4 представле-



I – бетулин, II – диацетат бетулина, III – дипропионат бетулина

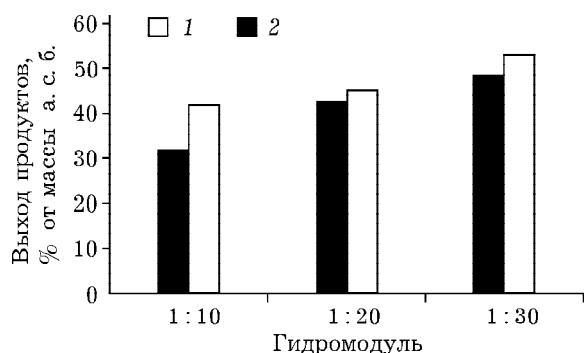


Рис. 4. Влияние величины гидро модуля на выход продуктов ацилирования бересты уксусной (1) и пропионовой (2) кислотами.

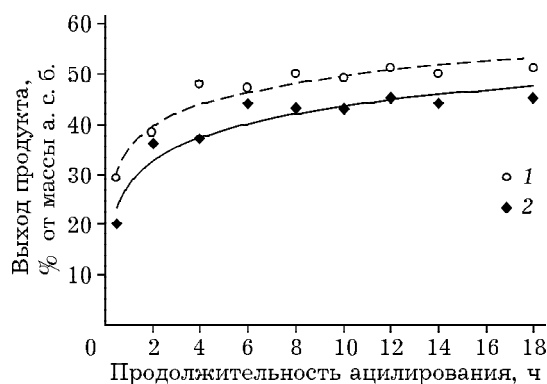


Рис. 5. Влияние продолжительности ацилирования бересты уксусной и пропионовой кислотами на выход продуктов при гидро модуле, равном 20. 1 – диацетат бетулина, 2 – дипропионат бетулина.

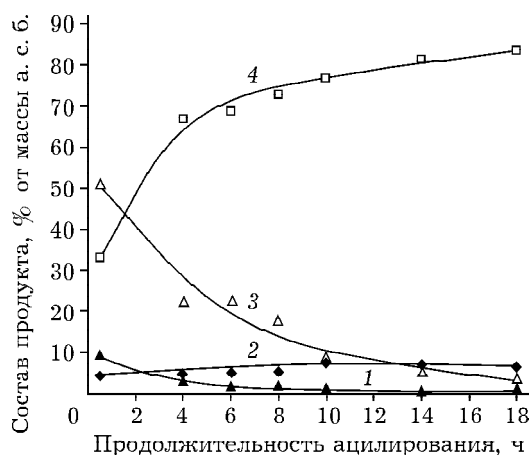


Рис. 6. Влияние продолжительности ацилирования бересты уксусной кислотой на состав образующихся продуктов: 1 – лулеол, 2 – ацетат лулеола, 3 – бетулин, 4 – ацетат бетулина.

ны результаты проведенных исследований по влиянию гидро модуля на выход продуктов ацилирования бересты уксусной и пропионовой кислотами. При гидро модуле 10 получен продукт ацилирования бересты пропионовой и уксусной кислотами с выходом 30 и 42 % от массы а. с. б. соответственно. Выход продуктов ацилирования бересты возрастает с увеличением гидро модуля до 20 и 30, достигая 42 и 48 % от массы а. с. б. для пропионовой кислоты, 45 и 53 % от массы а. с. б. для уксусной кислоты соответственно.

На рис. 5 показано влияние продолжительности ацилирования бересты уксусной и пропионовой кислотами на выход продуктов. С увеличением продолжительности ацилирования бересты с 30 мин до 8 ч выход продуктов ацилирования уксусной кислотой возрастает с 20 до 43 % от массы а. с. б., а пропионовой кислотой – с 29 до 50 % от массы а. с. б. С дальнейшим увеличением продолжительности обработки (более 8 ч) выход практически не изменяется.

На рис. 6 представлены данные по влиянию продолжительности обработки бересты (фракция 2–5 мм) уксусной кислотой на состав продуктов ацилирования, полученных с помощью ХМС. При продолжительности ацилирования 6 ч в полученном продукте содержится около 70 мас. % диацетата бетулина II. С увеличением продолжительности ацилирования с 0.5 до 18 ч содержание диацетата бетулина II в продукте возрастает от 33 до 84 мас. %, одновременно уменьшается содержание бетулина I – с 51 до 4 мас. %. Наблюдается также небольшое снижение концентрации лулеола и повышение содержания ацетата лулеола в продукте.

#### Влияние активации бересты водяным паром на выход продуктов ацилирования

Известным способом повышения реакционной способности твердого растительного сырья является его кратковременная активация перегретым водяным паром в условиях “взрывного автогидролиза”. Данная активация водяным паром была использована для интенсификации ацилирования бересты уксусной и пропионовой кислотами. Предобработку бересты водяным паром осуществляли при температуре 180 °С, давлении 3.4 МПа и продолжительности обработки от 60 до 300 с.

ТАБЛИЦА 2

Влияние продолжительности активации бересты водяным паром и ацелирования уксусной кислотой на выход продуктов

| Продолжительность ацелирования, ч | Продолжительность активации, с       |    |     |     |     |     |
|-----------------------------------|--------------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|
|                                   | 0                                    | 60 | 120 | 180 | 240 | 300 |
|                                   | Выход продуктов, % от массы а. с. б. |    |     |     |     |     |
| 0.5                               | 20                                   | 47 | 51  | 54  | 53  | 54  |
| 2                                 | 36                                   | 52 | 54  | 52  | 52  | 51  |
| 4                                 | 39                                   | 50 | 54  | 53  | 54  | 56  |
| 6                                 | 44                                   | 49 | 52  | 60  | 58  | 58  |
| 8                                 | 43                                   | 59 | 57  | 60  | 60  | 57  |

ТАБЛИЦА 3

Влияние продолжительности активации бересты водяным паром и ацилирования пропионовой кислотой на выход продуктов

| Продолжительность ацилирования, ч | Продолжительность активации, с       |    |     |     |     |     |
|-----------------------------------|--------------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|
|                                   | 0                                    | 60 | 120 | 180 | 240 | 300 |
|                                   | Выход продуктов, % от массы а. с. б. |    |     |     |     |     |
| 0.5                               | 29                                   | 43 | 45  | 47  | 47  | 44  |
| 2.0                               | 38                                   | 45 | 50  | 49  | 51  | 48  |
| 4.0                               | 48                                   | 47 | 51  | 49  | 54  | 49  |
| 8.0                               | 50                                   | 47 | 53  | 50  | 54  | 50  |

В табл. 2 и 3 представлены данные по влиянию продолжительности активации водяным паром и ацилирования бересты уксусной и пропионовой кислотами на выход продуктов.

Проведенные эксперименты показали, что предварительная активация бересты в условиях взрывного автогидролиза позволяет сократить продолжительность процесса ее ацилирования в 12 раз. При минимальной продолжительности активации бересты (60 с) и ацилирования (30 мин) выход продуктов ацелирования уксусной кислотой возрастает до 47 % от массы а. с. б., а для продуктов ацилирования пропионовой кислотой – до 43 % от массы а. с. б. После перекристаллизации из этилового спирта чистота полученных диацетатов бетулина составляет 93–95 %.

Испытания образцов диацетата бетулина **II** и дипропионата бетулина **III** на токсичность, проведенные на белых мышках в аккредитованном испытательном центре Красноярска (“Краевой ветеринарной лаборатории”), показали, что диацетат бетулина **II** и дипропионат бетулина

**III** в дозе 5000 и 4000 мг/кг соответственно не токсичны и могут использоваться для проведения фармакологических исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен новый одностадийный способ синтеза диацетата (**II**) и дипропионата (**III**) бетулина непосредственно из бересты березы, минуя стадию выделения бетулина. Этот способ основан на совмещении стадии экстракции бетулина из бересты и его этерификации уксусной либо пропионовой кислотами.

Идентификация полученных продуктов подтверждена физико-химическими методами.

Осуществлен подбор условий ацилирования бересты березы уксусной и пропионовой кислотами, обеспечивающих максимальный выход диацетата (**II**) и дипропионата (**III**) бетулина. Показано, что наибольший выход продуктов ацилирования из неактивированной коры березы уксусной и пропионовой кислотами (около 50 % от массы а. с. б.) наблюдается при гидромодуле 20 и продолжительности ацилирования более 8 ч, при этом достигается максимальное содержание диацетатов бетулина в продуктах (84 и 90 мас. % соответственно).

Установлено, что предварительная активация бересты в условиях взрывного автогидролиза в течение от 60 до 300 с позволяет сократить продолжительность ацилирования пропионовой и уксусной кислотами до 0.5 ч и увеличить выход продуктов до 47–54 % от массы а. с. б. соответственно. Чистота диацетатов бетулина после перекристаллизации из этилового спирта составляет 93–95 %.

Авторы выражают благодарность В. Ф. Каргину за снимки на сканирующем электронном микроскопе и В. А. Соколенко за снимки и помощь в интерпретации ПМР-спектров.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Толстиков Г. А., Флехтер О. Б., Балтина Л. А. // Химия уст. разв. 2005. Т. 13, № 6. С. 1–30.
- 2 Krasutsky P. A. // Nat. Prod. Rep. 2006. Vol. 23, No. 6. P. 919–942.
- 3 Кислицын А. Н. // Химия древесины. 1994. № 3. С. 3–28.
- 4 Абышев А. З., Агаев Э. М., Гусейнов А. Б. // Хим.-фарм. журн. 2007. Т. 41, № 8. С. 22–26.
- 5 Похилло Н. Д., Уварова Н. И. // Химия природ. соединений. 1988. № 3. С. 325–341.

- 6 Василенко Ю. К., Семенченко В. Ф., Фролова Л. М., Коноплева Г. В., Парфентьева Е. П., Скульте Н. В. // Эксперим. и клин. фармакол. 1993. Т. 56, № 4. С. 53–55.
- 7 Сымон А. В., Веселова Н. Н., Каплун А. П., Власенкова Н. К., Федорова Г. А., Лютик А. И., Герасимова Г. К., Швец В. И. // Биоорг. химия. 2005. Т. 31, № 1. С. 320 – 325.
- 8 Кузнецова С. А., Васильева Н. Ю., Калачева Г. С., Титова Н. М., Редькина Е. С., Скворцова Г. П. // Журн. Сиб. фед. ун-та. Химия. 2008. № 2. С. 151–165.
- 9 Флехтер О. Б., Медведева Н. И., Карачурина Л. Т., Балтина Л. А., Зарудий Ф. С., Галин Ф. З., Толстиков Г. А. // Хим.-фарм. журн. 2002. Т. 36, № 9. С. 29–32.
- 10 Пат. 2150473 РФ, 2000.
- 11 Пат. 2324700 РФ, 2008.
- 12 Оболенская А. В., Ельницкая З. П., Леонович А. А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: уч. пособие для вузов. М.: Экология, 1991.
- 13 Пат. 2074867 РФ, 1997.
- 14 Пат. 2119503 РФ, 1998.
- 15 Гравитис Я. А. // Химия древесины. 1987. № 5. С. 3–21.
- 16 Кузнецова С. А., Александрова Н. Б., Кузнецов Б. Н. // Химия уст. разв. 2001. Т. 9, № 5. С. 655–665.
- 17 Левданский В. А., Еськин А. П., Полежаева Н. И. // Химия раст. сырья. 1998. № 1. С. 5–9.