

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРИРОДНОГО ТРИТЕРПЕНОИДА БЕТУЛИНА ИЗ ЭНДЕМИЧНОЙ БЕРЕЗЫ КАЗАХСТАНА «BETULA KIRGHISORUM» И ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Р. З. Касенов¹, М.К. Ибраев¹, О. В. Демец¹, М. Р. Алиева¹

¹Карагандинский государственный технический университет, Караганда, Казахстан, e-mail: madiko8707@mail.ru)

Данная статья посвящена выделению природного тритерпеноида – бетулина из березы киргизской (*Betula kirghisorum*) и синтезу фосфорилированного производного бетулина. На территории Республики Казахстан произрастает 15 видов берез, в том числе 4 эндемичных вида. На территории Кентского лесничества Каркаралинского государственного национального природного парка был проведен сбор бересты березы киргизской. Бересту измельчали и сушили до постоянного веса. Из бересты березы киргизской методом экстракции с последующей перекристаллизацией из изопропилового спирта был выделен бетулин. Температура плавления выделенного вещества составляла 243⁰С. Бетулин идентифицировали с помощью тонкослойной хроматографии и сравнивали со стандартным образцом. Вещество анализировали методами инфракрасной спектроскопии в таблетках КВг и высокоэффективной жидкостной хроматографии. В Фурье - спектрометре ФСМ – 1201 с помощью характеристических частот полос поглощения было определено наличие в молекуле различных групп атомов и связей, характерных для бетулина. ВЭЖХ исследование образца проводилось с помощью жидкостного хроматографа Shimadzu LC – 20 Prominence. Проведен синтез фосфорилированного производного бетулина. Ход реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии. Полученное вещество анализировали методами ИК–спектроскопии, были идентифицированы полосы поглощения, характерные для групп Р–О–СН₃ при 1195см⁻¹ и Р=О при 1280см⁻¹. Для хроматографического исследования продукта использовался газовый хроматограф Agilent 7890А с масс-селективным детектором 5975 inert XL. По данным хроматографического анализа, также выявлено наличие фосфорного фрагмента в полученном веществе.

Ключевые слова: бетулин, береза киргизская, береста, экстракция, изопропиловый спирт, фильтрат, тонкослойная хроматография, пластины Silufol, элюент, проявитель, ИК – спектроскопия, ВЭЖХ.

ISOLATION OF THE NATURAL TRITERPENOID BETULIN FROM THE ENDEMIC BIRCH OF KAZAKHSTAN "BETULA KIRGHISORUM" AND OBTAINING NEW DERIVATIVES

R. Z. Kasenov¹, M. K. Ibraev¹, O. V. Demets¹, M. R. Aliyeva¹

¹ Karaganda state technical University, Karaganda, Kazakhstan, e-mail: madiko8707@mail.ru

This article is devoted to the isolation of a natural triterpenoid-betulin from the Kyrgyz birch (*Betula kirghisorum*) and the synthesis of a phosphorylated derivative of betulin. On the territory of the Republic of

Kazakhstan grows 15 species of birch, including 4 endemic species. On the territory of the Kentish forest area of the Karkarala state national natural Park, the collection of birch bark of the Kyrgyz birch was carried out. Birch bark was crushed and dried to a constant weight. Betulin was extracted from Kyrgyz birch bark by extraction with subsequent recrystallization from isopropyl alcohol. The melting point of the isolated substance was 243.0°C. Betulin was identified using thin-layer chromatography and compared with a standard sample. The substance was analyzed using infrared spectroscopy in KBr tablets and high-performance liquid chromatography. In the Fourier spectrometer FSM-1201, the presence of various groups of atoms and bonds characteristic of betulin in the molecule was determined using the characteristic frequencies of the absorption bands. HPLC study of the sample was carried out using a liquid chromatograph Shimadzu LC-20 Prominence. The synthesis of a phosphorylated betulin derivative was carried out. The progress of the reaction was monitored using thin layer chromatography. The resulting substance was analyzed by IR spectroscopy, and the absorption bands characteristic of the P–O–CH₃ groups at 1195 cm⁻¹ and P=O at 1280 cm⁻¹ were identified. The gas chromatograph Agilent 7890A with mass-selective detector 5975 inert XL was used for chromatographic study of the product. According to the chromatographic analysis, the presence of a phosphorus fragment in the resulting substance was also revealed.

Keywords: betulin, Kyrgyz birch, birch bark, extraction, isopropyl alcohol, filtrate, thin-layer chromatography, Silufol plates, eluent, developer, IR spectroscopy, HPLC.

Введение

В последнее время постоянно растет внимание специалистов к лекарственным препаратам природного происхождения. Интерес к применению таких препаратов, полученных из природного сырья обосновывается высокой эффективностью, широким спектром фармакологической активности, а также возможностью использования их в течение продолжительного времени без возникновения осложнений и побочных эффектов. Во всем мире увеличивается удельный вес и объем производства лекарственных препаратов, путем синтетических трансформаций веществ, выделяемых из дикорастущих и культивируемых растений. Вещества растительного происхождения находят широкое применение в качестве биологически активных добавок, агрохимических средств.

Химия растительных метаболитов терпеноидного класса сыграла большую роль в становлении и развитии важнейших разделов современной органической химии, а в настоящий период является и важным объектом исследований в медицине. Существенная часть от препаратов, введенных в медицинскую практику за последние три десятилетия, получена так называемым полусинтезом на основе терпеноидов. Известно, что лупановые тритерпеноиды обладают широким спектром биологической активности [1]. Перспективным источником для получения этих соединений служат растения семейства Betulaceae. Из внешнего слоя коры выделяют сумму тритерпеноидов, преобладающим компонентом, которой является бетулин. В связи с этим, большое значение имеет изучение данного

соединения для дальнейших его преобразований и модификаций. Целенаправленная трансформация подобных природных биологически активных веществ приводит к появлению совершенно новых соединений, которые будут обладать более широким спектром действия и использоваться в разных областях.

Целью настоящей работы является тритерпеноид лупанового ряда (бетулин), получаемый из представленных в Карагандинской области древесных растений рода Береза вид киргизская (*Betula* вида *kirghisorum*). Достаточная сырьевая база и биологическая активность бетулина ставят его в ряд ценных природных источников для использования как в нативном состоянии, так и в виде различных продуктов трансформации, а также делает актуальным разработку лекарственных препаратов на его основе[2].

Материалы и методы

Бетулин (3 β , 28-гидрокси – 20(29) – лупен) является тритерпеноидом лупанового ряда и является одним из основных компонентов, получаемых из коры березы. В последнее время наблюдается неуклонно растущий интерес к бетулину и его производным, обусловленный широким спектром биологической активности этих соединений [3]. Доказано, что бетулин и ряд его производных обладают антиоксидантными, противовоспалительными, противоопухолевыми, антивирусными, антисептическими, гепатопротекторными свойствами [4], также производные бетулина проявляют анти – ВИЧ активность [5]. Различные фармацевтические фирмы ближнего и дальнего зарубежья выпускают препараты на основе бетулина в виде экстрактов, драже, сиропов и капсул для профилактики и лечения различных заболеваний. Доступность бетулина, а также высокая и разнообразная биологическая активность других природных тритерпеноидов проявляют интерес к проведению химических трансформаций тритерпеноидов лупанового ряда[6]. В отличие от многих других циклических соединений, имеющих плоскостное строение, тритерпеноиды характеризуются трехмерной пространственной конфигурацией, особенности которой оказывают существенное влияние на их реакционную способность и биологическую активность [7]. Бетулин активен для подавления развития вирусов герпеса. Найдена туберкулостатическая активность бетулина, проявляющаяся в ингибировании развития микобактерий. В настоящее время на основе бетулина и его производных разрабатываются новые биологически активные пищевые добавки и новые препараты[8]. Существующие методы получения и очистки бетулина и его производных являются достаточно трудоемкими и энергетически затратными, что существенно повышает их стоимость и ограничивает области применения в качестве биологически активного вещества [9].

Наружная часть бересты *B. kirghisorum* издавна использовалась для получения берестового дегтя, который применяется в фармакологии и ветеринарии, как антисептик и противочесоточное средство. Береста в народной медицине использовалась в качестве антисептика при лечении гнойных ран и различных кожных заболеваний. Бетулин обладает антисептическими свойствами, который в дальнейшем могли использовать для стерилизации пластырей и бинтов [10 - 11]. Цитотоксическая активность производных бетулина исследована по отношению к различным раковым клеткам. Наиболее выраженной противоопухолевой активностью обладает бетулиновая кислота, являющаяся селективным ингибитором роста клеток меланомы человека, ингибитором роста раковых клеток, так же может подавлять вирус ВИЧ-инфекции [12]. Бетулиновая кислота обладает противовоспалительной активностью, а бетулоновая – против язвенной. Производные бетулоновой кислоты также проявляют антиоксидантные свойства [13].

В данной работе были использованы методы экстракции, перекристаллизации, тонкослойной хроматографии, инфракрасная спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Основная часть и результаты

В августе и ноябре 2019 года на территории Кентского лесничества Каркаралинского государственного национального природного парка, недалеко от населенного пункта Кент был произведен сбор растительного сырья березы киргизской (Рис. 1).



Рисунок 1. Береза киргизская (Каркаралинский государственный национальный природный парк, Кентское лесничество, ноябрь 2019 г.)

Из березы киргизской методом экстракции с последующей перекристаллизацией из изопропилового спирта был выделен бетулин. В качестве сырья использовали внешнюю часть коры березы (бересту) *Betula kirghisorum*. Бересту измельчали до частиц размером 5 – 8 мм, сушили при 100⁰ С до постоянного веса.

Экстракцию проводили по известной методике [14]. В круглодонную колбу объемом 2 литра, снабженную мешалкой и обратным холодильником, загружали 400 грамм сырья. В колбу приливали 300 мл 20% раствора гидроксида натрия и 750 мл изопропилового спирта. Затем реакционную смесь кипятили на водяной бане в течение 5 часов при интенсивном перемешивании. После кипячения реакционную массу быстро отфильтровывали от остатков негидролизованной бересты на воронке Бюхнера. В фильтрате образовался кремовый хлопьевидный осадок. Фильтрат охладили и перенесли на бумажный фильтр. Осадок, не прошедший через фильтровальную бумагу, высушили. Получили порошок желтого цвета.

Перекристаллизацию продукта проводили в изопропиловом спирте. В термостойкий стакан помещали полученный желтый порошок, приливали изопропиловый спирт и кипятили в течение 10 мин до полного растворения осадка. Горячий раствор перенесли на бумажный фильтр. Полученный фильтрат охлаждали и оставили на 12 часов для кристаллизации. Выпавший хлопьевидный осадок отфильтровали, высушили до постоянного веса. Перекристаллизацию продукта проводили до получения белого аморфного вещества несколько раз [15].

Полученное вещество идентифицировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Silufol с использованием элюирующих систем: бензол: хлористый метилен: этиловый спирт = 5:5:1. Детектирование пятен осуществляли 10% раствором фосфорномолибденовой кислоты с последующим нагреванием пластины в течение 3 – 4 минут. Вещество сравнивали с образцом бетулина, предоставленного сотрудниками лаборатории органического синтеза Томского государственного университета. Хроматограмма показала, что образец и исследуемое вещество идентичны.

Далее полученное нами вещество анализировали с помощью инфракрасной спектроскопии (ИК– спектроскопии) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Регистрацию ИК – спектров проводили на Фурье – спектрометре марки ФСМ – 1201, в диапазоне длин волн 500 – 4000см⁻¹ в таблетках бромида калия (Рис. 2).

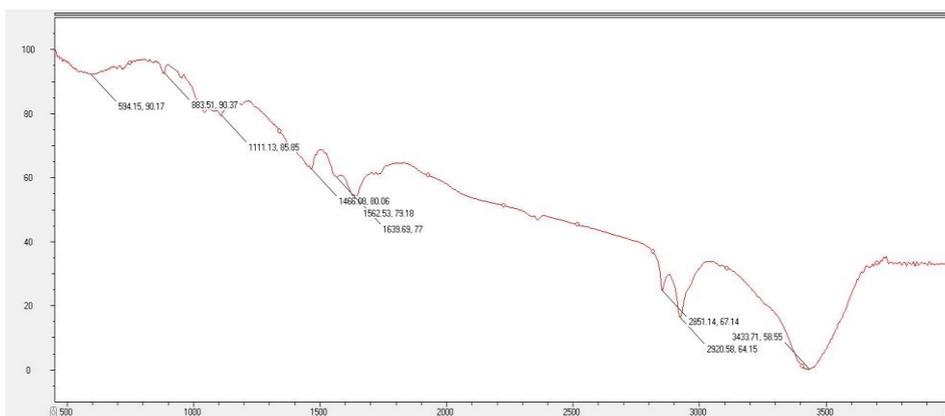


Рисунок 2. ИК – спектр образца вещества

С помощью характеристических частот полос поглощения было определено наличие в молекуле различных групп атомов и связей, характерных для молекулы бетулина (Рис. 3).

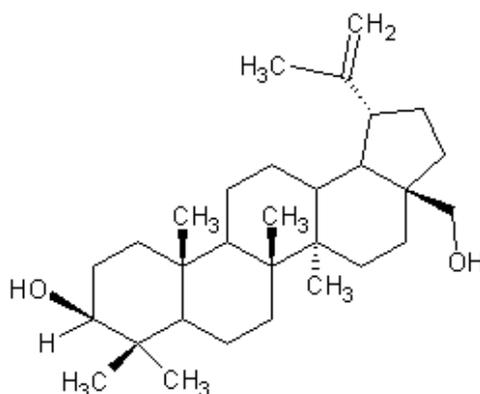


Рисунок 3. Структурная формула бетулина

Были идентифицированы полосы поглощения, характерные для следующих групп атомов: имеется широкая полоса поглощения, принадлежащая валентным колебаниям гидроксильных групп, при 3433 см^{-1} ; валентные колебания, характерные для C – H групп лупанового скелета, при 2920 и 2851 см^{-1} ; валентные колебания двойной связи C=C при 1639 см^{-1} ; деформационные колебания CH_2 групп наблюдаются при 1466 см^{-1} ; валентные колебания C – O группы наблюдаются при 1111 см^{-1} ; деформационные колебания CH_3 групп – при 883 см^{-1} . Сравнение ИК – спектра полученного образца с ИК – спектрами, приведенными в различных источниках, позволяет сделать заключение, что полученное нами вещество – бетулин. ВЭЖХ исследование образца (Рис. 4) проводилось с помощью жидкостного хроматографа Shimadzu LC – 20 Prominence, колонка Zorbax размером $150 \times 4,6$ мм, спектрофотометрический детектор SPD 20 AV. Подвижной фазой являлась смесь растворителей: ацетонитрил – вода (3:1). Элюирование проводилось изократическое.

Температура колонки – 40 °С. Объемная скорость потока – 0,8 мл/мин. Время анализа – 25 минут. Температура ячейки детектора – 40 °С.

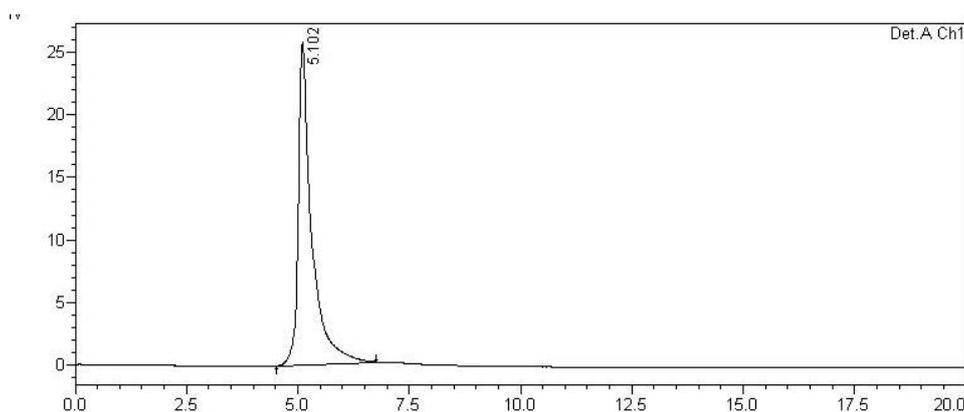


Рисунок 4. ВЭЖХ анализ вещества

Подобранные условия обеспечивают пригодность методики ВЭЖХ для качественного и количественного определения бетулина. Как видно из рисунка 4 время удерживания для вещества составляет 5,1 минут. Согласно хроматограмме, чистота выделенного вещества составляет 100%. Температура плавления, определенная на приборе Stuart SMP 10, составила 243 °С.

Далее был проведен синтез фосфорилирования производного бетулина. Синтез фосфорилированных производных бетулина проводили по следующей методике: в двухгорлую колбу, снабженную мешалкой и обратным холодильником, поместили 0,8 г бетулина (0,01 М), 1,6 г триэтиламина (0,01 М) и при нагревании растворили в 40 мл бензола. В эту смесь добавили 0,6 мл (0,01 М) диметилхлорфосфата. Реакцию проводили при температуре 75°С в течение 6 часов при непрерывном перемешивании. После упаривания растворителя выпал осадок белого цвета. Присоединение фосфорсодержащего фрагмента к молекуле бетулина происходит по следующей схеме (Рис.5):

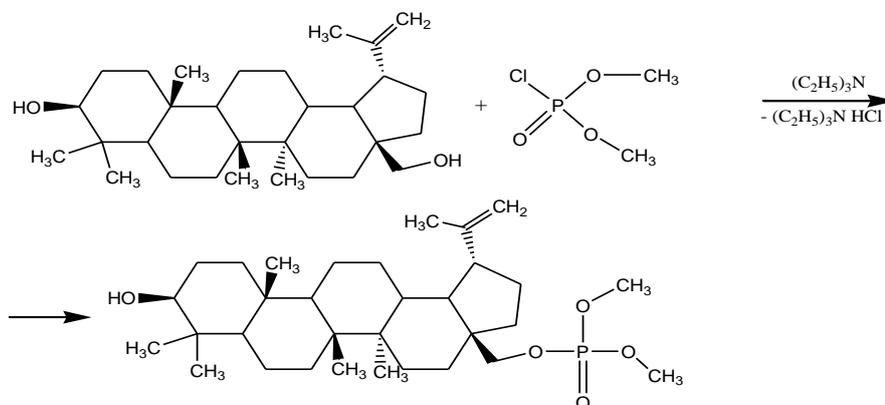


Рисунок 5. Реакция бетулина с диметилхлорфосфатом

Ход реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии. Полученное вещество анализировали методами ИК–спектроскопии (Рис. 6).

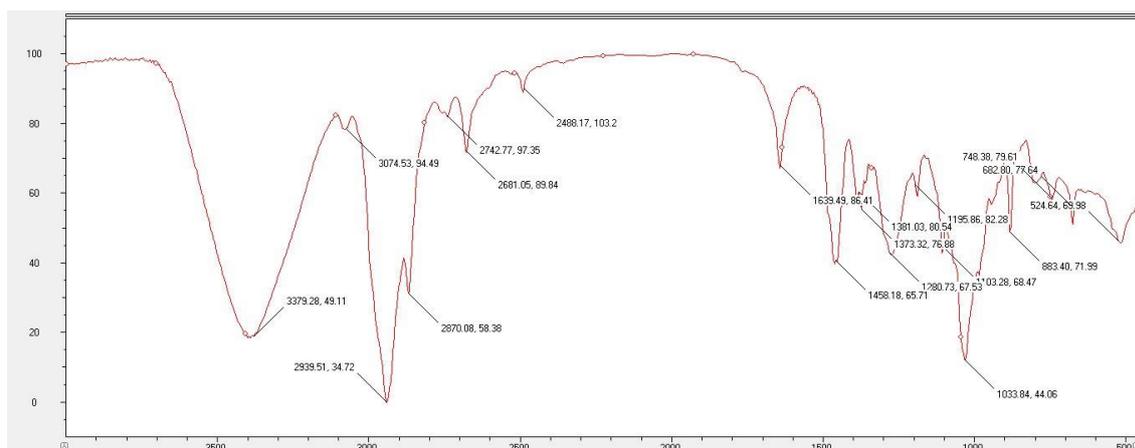


Рисунок 6 – ИК – спектр фосфорилированного производного бетулина

По данным ИК–спектроскопии наряду с полосами поглощения, характерных для бетулинового фрагмента, были идентифицированы полосы поглощения, характерные для групп P–O–CH₃ при 1195см⁻¹ и P=O при 1280см⁻¹.

Для хроматографического исследования продукта использовался газовой хроматограф Agilent 7890A с масс-селективным детектором 5975 inert XL. По данным хроматографического анализа, также выявлено наличие фосфорного фрагмента в полученном веществе (Рис. 7).

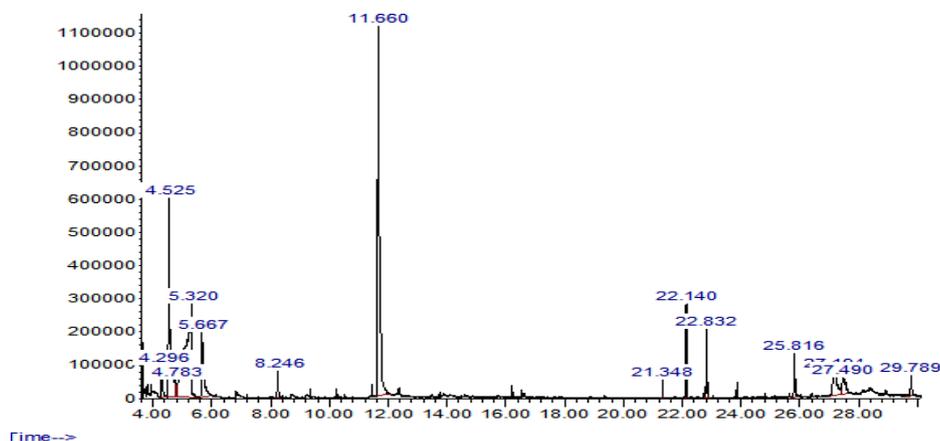


Рисунок 7. Хромато–масс спектр фосфорилированного производного бетулина

Таким образом, по данным ИК– и хромато – масс- спектроскопии установлено, что реакция присоединения фосфатных групп к молекуле бетулина происходит в положении – 28.

Заключение

Работа посвящена выделению пентациклического тритерпеноида бетулина из бересты березы киргизской и синтезу фосфорилирования производного бетулина. Береза киргизская (*Betula kirghisorum*) является эндемичным растением, занесенным в Красную книгу Казахстана. Сбор сырья был проведен на территории Кентского лесничества Каркаралинского государственного национального природного парка. Выделение бетулина осуществлялось методом экстракции из изопропилового спирта, гидролизованного в водном растворе щелочи. Вещество несколько раз перекристаллизовывали для получения чистого бетулина, используя изопропиловый спирт. Бетулин идентифицировали методом ТСХ на пластинах Silufol и анализировали с использованием методов ИК-спектрокопии, ВЭЖХ. В качестве стандарта использовали образец, предоставленный учеными Томского государственного университета РФ. С помощью характеристических частот поглощения в спектрах ИК было определено наличие в соединении различных групп атомов и связей, характерных для молекулы бетулина. Методом ВЭЖХ проведены качественный и количественный анализ бетулина. Из березы киргизской данное вещество выделено впервые.

Осуществлен синтез на основе бетулина новых биологически активных его производных. Получен фосфорилированный производный бетулина, анализированы строение с помощью ВЭЖХ, ИК- и хромато масс- спектроскопии.

Список литературы

- 1 Энциклопедия декоративных садовых растений // [ЭР]. — Режим доступа: [https:// flower.onego.ru](https://flower.onego.ru)
- 2 Сайт Каркаралинского государственного национального природного парка// [ЭР]. — Режим доступа: <https://karkaralinsk – park.ru>
- 3 Кислицын А.Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение // Химия древесины. 1994. №3. С. 3 – 28.
- 4 Толстиков Г. А. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность / Х Флехтер О.Б., Шульц Э.Э. и др.// Химия в интересах устойчивого развития. 2005. №13. С . 1 – 13.
- 5 Matsuda H. Hepatoprotective, superoxide scavenging and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica* / Ishikado A., Nishida N. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*. 1998. Vol. 8. Pp. 2939 – 2944.
- 6 Urban 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. Изучение состава этанольного экстракта березы и его токсико – фармакологических свойств / Кузнецова С.А., Скворцова Г. П, Калачева Г.С., Зайбель И.А., Ханчич О.В , // Химия растительного сырья. 2010. №1. С. 137 – 141.
- 8 Evers M. Betulinic Acid Derivatives: A New Class of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Specific Inhibitors with a New Mode of Action / Poujade C., Soler F. et. al. // J. Med. Chem. 1996. Vol. 39. Pp. 1056 – 1068.
- 9 Левданский В. А. Экстракция бетулина алифатическими спиртами С3 – С4 из бересты березы, гидролизованной в водном растворе щелочи / Левданский В.А., Левданский А.В. // Химия растительного сырья .2014. №1. С. 131 – 137.
- 10 Mukherjee R. Betulinic acid derivatives as anticancer agents: structure activity relationship / R. Mukherjee, V. Kumar, S. K. Srivastava // Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. – 2006. – vol. 6. – №3. – С. 271–279.
- 11 Толстиков И.Г. Терпеноиды ряда лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы / И.Г. Толстиков, И.В. Сорокина, Г.А. Толстиков и др. // Биоорганическая химия. – 2006. – №1. – С.42-55. – 32 т.,
- 12 И. В. Сорокина, Е. Б. Бубнова, Т. Г. Толстикова и др., Тез. докл. XII Междунар. семинара «Медицина XXI века», Низкие Татры, Словакия, 2004. - с. 21.
- 13 Кузнецов Б.Н. Совершенствование методов выделения, изучение состава и свойств экстрактов березы. / Б.Н. Кузнецов, С.А. Кузнецова, В.А. Левданский. // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. – № 13. – С. 391-400.
- 14 Садриева О.А. Кинетика извлечения бетулина из отходов переработки березы. О.А. Садриева, Л.И.Селянина. – Архангельск. – 2002. II Всероссийская конференция Химия и технология растительных веществ 24-27 июня 2002 г.
- 15 Левданский В. А. Экстракция бетулина алифатическими спиртами С3 – С4 из бересты березы, гидролизованной в водном растворе щелочи / Левданский В.А., Левданский А.В. // Химия растительного сырья .2014. №1. С. 131 – 137.