

УДК 547.914.4+581.192.2

Влияние условий ацилирования пропионовой кислотой бересты коры березы и её активации на выход и состав экстрактов

С.А. Кузнецова^{а,б*},

Г.П. Скворцова^а, Е. С. Скурыдина^а,

Ю. Н. Маляр^а, О.А. Ханчич^в

^а *Институт химии и химической технологии СО РАН,
Россия 660049, Красноярск, ул. К. Маркса, 42*

^б *Сибирский федеральный университет,
Россия 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79*

^в *Российский государственный
университет туризма и сервиса,
Россия 141221, Московская обл., Пушкинский район,
п. Черкизово, ул. Главная, 99¹*

Received 2.09.2011, received in revised form 9.09.2011, accepted 16.09.2011

Изучено влияние условий ацилирования пропионовой кислотой бересты коры березы и ее кратковременной активации перегретым водяным паром на выход и состав получаемых тритерпеновых продуктов. Установлено, что в зависимости от условий ацилирования можно получить экстракты с разным содержанием дипропионата бетулина, монопропионата бетулина, бетулина и лупеола. Показано, что экстракт с наибольшим содержанием дипропионата бетулина 85-91 % получен из исходной бересты фракции 2-5 мм и предварительно активированной бересты фракции 10-20 мм. Структура дипропионата бетулина подтверждена методами элементного анализа, FTIR, ПМР и С13ЯМР-спектроскопии.

Ключевые слова: береста коры березы, ацилирование, пропионовая кислота, дипропионат бетулина, активация, перегретый пар.

Природный тритерпеноид бетулин и его производные обладают широким спектром биологической активности. Известно, что бетулин обладает антисептическими свойствами, противоопухолевой, ранозаживляющей, желчегонной и гепатопротекторной активностью. В настоящее время синтезировано более 240 производных бетулина, обладающих ценными фар-

* Corresponding author E-mail address: ksa@icct.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

макологическими свойствами, в том числе аллобетулин, бетулиновая кислота, аминопроизводные, серосодержащие соединения и сложные эфиры бетулина [1-9].

Известные способы получения эфиров бетулина базируются, в основном, на реакциях ацилирования бетулина и требуют обязательной дополнительной стадии выделения бетулина из бересты березы [6, 10, 11].

Авторами предложены одностадийные способы получения диацетатов бетулина из бересты коры березы, основанные на совмещении стадии экстракции бетулина из бересты и его ацилирования уксусной, пропионовой и масляной кислотами [12-16].

На примере получения диацетата бетулина из бересты коры березы было показано, что предварительная кратковременная активация бересты перегретым водяным паром в условиях «взрывного автогидролиза» в течение 60 с позволяет сократить продолжительность процесса ацилирования до 30 мин [15].

Пропионовая кислота входит в состав некоторых анальгетиков и нестероидных противовоспалительных средств, таких как ибупрофен, феноболлин, напроксен, а также душистых веществ. Кроме того, пропионовая кислота препятствует росту плесени и некоторых бактерий, поэтому используется в качестве консервантов продуктов [17].

Поскольку бетулин и пропионовая кислота обладают разнообразной фармакологической активностью, то производное бетулина – дипропионат бетулина – может проявлять новые фармакологические свойства. Кроме того, по аналогии с диацетатом бетулина дипропионат бетулина может использоваться для синтезов новых производных бетулина.

В продолжение наших работ по получению и изучению свойств тритерпеновых соединений из бересты коры березы [12-16, 18-21] целью данной работы является изучение влияния условий предварительной кратковременной активации перегретым водяным паром измельченной бересты коры березы и её ацилирования пропионовой кислотой на выход и состав получаемых экстрактов.

Дипропионат бетулина – 3 β, 28 – дипропиокси – луп 20 (29)- ен (1) – сложный эфир пропионовой кислоты и бетулина (рис. 1).

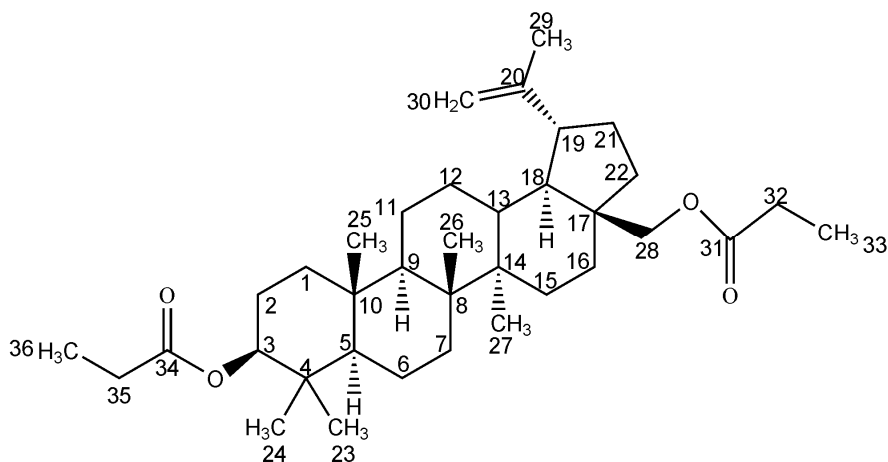


Рис. 1. Структура дипропионата бетулина

Методика эксперимента

В качестве исходного сырья использовали бересту коры березы *Betula pendula* Roth, измельченную до фракции 2-5, 10-20 мм, и бересту, активированную перегретым водяным паром. Активацию бересты перегретым водяным паром в условиях «взрывного автогидролиза» проводили на установке, описанной в работах [22, 23]. Анализ химического состава бересты был проведен по известным в химии древесины методикам по схеме, описанной в работе [15].

Дипропионат бетулина синтезировали и перекристаллизовывали из этанола с применением активированного угля марки ОУ-Г по методике, описанной в патенте [13].

Анализ экстрактов проводили на газовом хроматографе 6890N (Agilent, США). Условия хроматографии были следующими: 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. Детектор пламенно-ионизационный (ПИД).

Элементный анализ дипропионата бетулина проводили с использованием элементного анализатора FLASH™ 1112.

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

PMР- и ¹³C-ЯМР-спектры были сняты на спектрометре Bruker Avance 600 при частоте 600 МГц=¹H), растворитель – CDCl₃.

Результаты и обсуждение

При кипячении измельченной бересты коры березы в пропионовой кислоте наряду с экстракцией бетулина в раствор протекает также реакция ацилирования с получением дипропионата бетулина.

Для получения дипропионата бетулина с наибольшим выходом варьировали гидромодуль (соотношение массы бересты к объёму пропионовой кислоты) от 1:10 до 1:30, степень измельчения бересты (2-5 и 10–20 мм) и продолжительность ацилирования.

При гидромодуле (ГМ) 1:10 выход продукта ацилирования бересты кипящей пропионовой кислотой составил 31 % от массы а.с.б. , с увеличением объема пропионовой кислоты в 2 раза (ГМ 1:20) выход продукта увеличился до 45 % от массы а.с.б. Увеличение объема пропионовой кислоты в 3 раза (ГМ 1:30) не привело к значительному повышению выхода продукта, поэтому последующие серии экспериментов были проведены при ГМ 1:20.

Влияние степени измельчения и продолжительности ацилирования бересты берёзы пропионовой кислотой на выход продуктов представлено на рис. 2.

С увеличением продолжительности ацилирования бересты кипящей пропионовой кислотой возрастает выход продуктов. Причем наибольший выход продуктов 40-43 % от массы а.с.б. получен для исходной бересты фракции 2-5 мм и 48-50 % от массы а.с.б. для бересты фракции 10–20 мм при продолжительности 6-8 ч. Бетулин находится в широких тонкостенных клетках наружного слоя коры березы и легко высыпается наружу при механическом измельчении бересты, поэтому выход продукта больше для фракции бересты 10–20 мм [15,24].

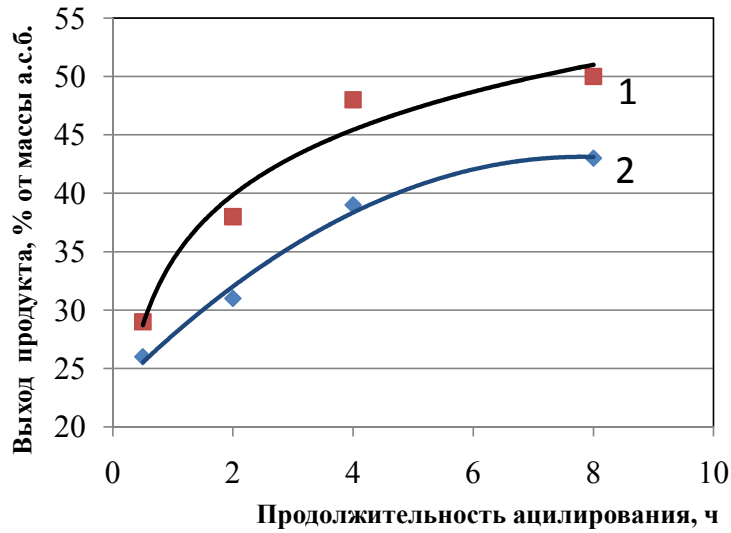


Рис. 2. Влияние степени измельчения бересты и продолжительности её ацилирования пропионовой кислотой на выход продуктов: 1 – береста фр. 2-5 мм; 2 – береста фр. 10-20 мм

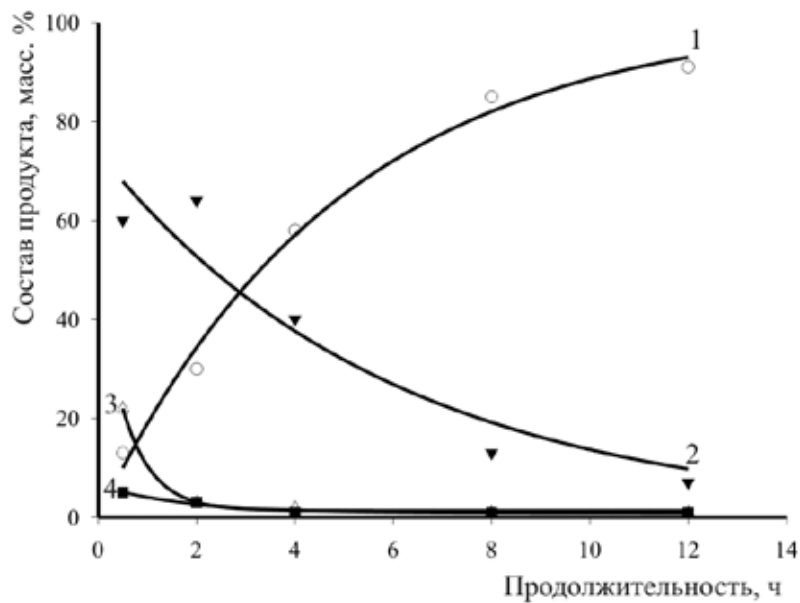


Рис. 3. Влияние продолжительности ацилирования бересты фракции 2-5 мм кипящей пропионовой кислотой на состав продуктов: 1 – дипропионат бетулина, 2 – монопропионат бетулина ; 3 – бетулин; 4 – лупеол

В таблице 1 и на рисунке 3 представлены данные по выходу и составу продуктов ацилирования исходной бересты кипящей пропионовой кислотой.

В составе продуктов ацилирования бересты кипящей пропионовой кислотой были обнаружены следующие компоненты: дипропионат бетулина, монопропионат бетулина, бетулин, лупеол.

Представленные в табл. 1 и на рис. 3 данные свидетельствуют о том, что с увеличением продолжительности ацилирования исходной бересты фракции 2-5 мм до 12 ч содержание дипропионата бетулина в продукте увеличивается от 13 до 91 % от массы продукта, а остальных компонентов снижается: монопропионата бетулина от 60 до 7, бетулина – от 22 до 1, а лупеола от 7 до 1 масс. %. Для бересты фракции 10-20 мм с увеличением продолжительности ацилирования до 8 ч, содержание дипропионата бетулина в продукте увеличивается от 8 до 51 масс. %, а содержание остальных компонентов снижается: монопропионата бетулина от 64 до 7, бетулина – от 33 до 3, а лупеола – от 5 до 1 масс. %.

С целью интенсификации процесса ацилирования бересты кипящей пропионовой кислотой и увеличения выхода продуктов была проведена кратковременная активация бересты перегретым водяным паром методом «взрывного» автогидролиза [18, 25]. В таблице 2 приведены данные, иллюстрирующие влияние условий предварительной активации бересты березы фракции 10-20 мм перегретым водяным паром и последующего ацилирования пропионовой кислотой на выход и состав продуктов. Из таблицы следует, что предварительная активация бересты коры березы позволяет сократить продолжительность ацилирования до 30 мин и повысить выход продукта до 47 % массы а.с.б.. Следует отметить, что основным компонентом данного продукта является монопропионат бетулина (64 %), а содержание дипропионата бетулина в продукте составляет 20 %.

При увеличении продолжительности ацилирования предварительно активированной перегретым водяным паром при 240 °С бересты коры березы до 8 ч выход продукта возрастает до 54 % массы а.с.б., а содержание в нем дипропионата бетулина составляет 86 %.

Выделенный и перекристаллизованный из этилового спирта дипропионат бетулина (3β-, 28-дипропиокси-луп-20(29)-ен-1) представляет собой порошок белого цвета с температурой плавления 149 °С.

Таблица 1. Влияние продолжительности ацилирования исходной бересты фракции 2-5 мм кипящей пропионовой кислотой на выход и состав продуктов

Продолжительность ацилирования, ч	Выход продуктов, % от массы а.с.б.	Состав продуктов, % массы продукта*			
		ДПБ	МПБ	Бетулин	Лупеол
0,5	23	13	60	22	5
2,0	31	30	64	3	3
4,0	39	58	39	2	1
8,0	43	85	13	1	1
12,0	45	91	7	1	1

ДПБ – дипропионат бетулина, МПБ – монопропионат бетулина.

Таблица 2. Влияние продолжительности активации и ацилирования бересты фракции 10-20 мм пропионовой кислотой на выход и состав продуктов*

Продолжительность ацилирования, ч	Продолжительность активации, с	Выход продуктов, % от масс. а.с.б.	Состав продуктов, % от массы продукта			
			ДПБ	МПБ	Бетулин	Лупеол
0,5	неактивированная береста	29	8	52	33	7
	120	45	20	64	10	6
	180	47	8	53	32	7
	240	47	15	58	19	8
4,0	неактивированная береста	40	50	44	4	2
	120	51	61	35	0	6
	180	49	50	48	0	2
	240	54	55	34	5	6
8,0	неактивированная береста	50	59	37	3	1
	120	53	68	26	1	5
	180	50	55	39	1	5
	240	54	85	10	0	5

* Условия взрывного автогидролиза: T=180°C, P=3,4 МПа, ДПБ – дипропионат бетулина, МПБ – монопропионат бетулина

На основании данных элементного анализа перекристаллизованного дипропионата бетулина найдено, %:(С) 80, (Н) 10, (О) 10. Вычислено, %:(С) 78, (Н) 11, (О) 11.

ИК-спектр дипропионата бетулина содержит следующие п.п. (ν , см⁻¹): 3067,02 (С=C); 2956,98; 2871,82 (С-Н); 1735,79; 1641,88 (С=О); 1461,80; 1423,84; 1389,97; 1355,27 (С-С); 1276,09; 1261,10; 1185,80; 1148,72; 1105,54; 1083,88 (С-О-С).

Спектр ¹³С-ЯМР дипропионата бетулина (CDCl₃, мд, δ): 174.92, 174.30, 150.17, 109.86, 80.63, 62.56, 55.39, 50.30, 48.91, 47.44, 46.44, 42.71, 40.91, 38.38, 37.89, 37.57, 37.08, 34.56, 34.13, 29.80, 29.61, 28.08, 27.96, 27.74, 27.05, 25.18, 23.72, 20.81, 19.13, 18.17, 16.53, 16.15, 16.04, 14.75, 9.35, 9.24.

Спектр ¹Н-ЯМР дипропионата бетулина (CDCl₃, мд, δ): 4.71m(1H,=CH₂); 4.61m(1H,=CH₂); 4.49dd(J 10.75 гц, J 5.65 гц, H3); 4.29dd(1H, J 12.1гц, J 1.4 гц, H28); 3.87d(1H, J 12.1 гц, H28); 2.49(1H,ddd, J 11.2, J 11.2, J 5.76 гц, H19); 2.37(2H,q, J7.56 гц.); 2.345q, 2.347q (2H.J 7.54 и J 7.64 гц.) H32, H35; 1.70(3H,H30); 1.18t, 1.17t(6H,2CH₃, J11.2 гц, H33, H36); 1.16s,0.99s, 0.88s, 0.86s, 0.86s(15H,5CH₃, H23, H24, H25, H26, H27).

Спектр ¹³С-ЯМР дипропионата бетулина имеет 36 сигналов, что соответствует брутто-формуле C₃₆H₅₄O₄. В отличие от бетулина дипропионат бетулина имеет 6 дополнительных сигналов пропионильных групп: 174.92 и 174.30 мд (две карбонильные группы С31, С34), 28.08 и 27.74 (две метиленовые, С32 и С35), 9.35 и 9.24 (две метильные группы С33 и С36). Остальные сигналы спектра дипропионата бетулина близки к сигналам спектра диацетата бетулина. Это указывает, что остов бетулина остался не затронутым в ходе реакции.

В отличие от бетулина в спектре ПМР дипропионата бетулина имеются сигналы, которые по химическим сдвигам, константам спин-спинового расщепления относятся к двум пропионильным группам: 2.37q(CH₂), 2.345q, 2.347q(CH₂), 1.17t и 1.18t (2CH₃). Два сигнала метиленовой группы в одной из пропионильных групп указывают на существование конформационных изомеров.

Выводы

Проведено сопоставление выхода и состава продуктов ацилирования кипящей пропионовой кислотой исходной и активированной перегретым водяным паром в условиях «взрывного автогидролиза» бересты коры березы.

Подобраны условия ацилирования бересты, позволяющие получать продукты с наибольшим выходом и наибольшим содержанием дипропионата бетулина и монопропионата бетулина.

Показано, что экстракт с наибольшим содержанием дипропионата бетулина (85-91 %) получен из исходной бересты фракции 2-5 мм и предварительно активированной бересты фракции 10-20 мм.

Установлено, что кратковременная активация бересты фракции 10–20 мм перегретым водяным паром позволяет сократить продолжительность ацилирования в 16 раз и получить продукт с выходом 47 % от массы а.с.б., при этом основным компонентом является монопропионат бетулина (64 масс. %).

Структура дипропионата бетулина подтверждена методами элементного анализа, FTIR, ПМР и C¹³ЯМР-спектроскопии.

Список литературы

1. Василенко Ю.К., Семенченко В.Ф., Фролова Л.М. и др. Фармакологические свойства тритерпеноидов коры березы // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1993. Т. 56. №4. С. 53–55.
2. Толстиков А.Г., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А. и др. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность // Химия в интересах устойчивого развития. 2005. №13. С. 1–30.
3. Флехтер О.Б., Бореко Е.И., Нигматулина Л.Р. и др. Синтез и фармакологическая активность ацилированных оксимов бетулоновой кислоты и 28-оксо-аллобетулона // Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т. 38. №3. С. 31–34.
4. Hisashi Matsuda, Atsushi Ishikado, Norihisa Nishida et al. Hepatoprotective, superoxide scavenging and antioxidant activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica* // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1998. V. 8. P. 2939–2944.
5. Флехтер О.Б., Бореко Е.И., Нигматулина Л.Р. и др. Синтез и противовирусные свойства производных лупановых тритерпеноидов // Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т. 38. №7. С. 10 – 14.
6. Сымон А.В., Веселова Н.Н., Каплун А.П. и др. Синтез циклопропановых производных бетулиновой и бетулоновой кислот и их противоопухолевая активность // Биоорганическая химия. 2005. Т. 31, №3. С. 320–325

7. Patent 7041701 (US). Triterpenoid derivatives / M. Hajduch, J. Sarek / 09.04.2006.
8. Maurya S.K., Devi S., Pandey V.B., Khosa R.I. Content of betulin and betulinic acid, antitumor agents *Zizyphus* species // *Fitoterapia*. 1989. V. 60, №5. P. 468–469.
9. Fulda S., Scaffidi C., Susin S.A. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 8, №51. P. 33942–33948.
10. Патент №2150473 (РФ). Способ получения диацетата бетулинола / А.Н. Кислицын, А.Н. Трофимов / опубл. 10.06.2000.
11. Patent 2001-288222 (Japan). Polymer obtained from betulin and its production method / K. Kobubshi, H. Kensetsu / 16.10.2001.
12. Патент №2324700 (РФ). Способ получения диацетата бетулинола / С.А. Кузнецова, Б.Н. Кузнецов, Е.С. Редькина, В.А. Соколенко, Г.П. Скворцова / опубл. 20.05.2008.
13. Патент №2415148 (РФ). Способ получения дипропионата бетулинола / С.А. Кузнецова, Е.С. Скурыдина, Б.Н. Кузнецов, Г.П. Скворцова / опубл. 27.03.2011.
14. Кузнецова С.А., Васильева Н.Ю., Калачева Г.С., Титова Н.М., Редькина Е.С., Скворцова Г.П. Получение диацетата бетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантной активности // *Журнал Сибирского федерального университета. Химия*. 2008. Т. 1. №2. С. 151–165.
15. Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Скворцова Г.П., Скурыдина Е.С., Калачева Г.С. Влияние условий ацилирования и предварительной обработки бересты коры берёзы на выход и состав тритерпеновых продуктов // *Журнал Сибирского федерального университета. Химия*. 2010. Т. 3. №2. с. 174–182.
16. Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Скворцова Г.П., Васильева Н.Ю., Скурыдина Е.С., Калачева Г.С. Разработка способов получения диацилов бетулина из коры березы // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2010. Т. 18. №3. С. 313–320.
17. Бартон Д., Оллис У.Д. *Общая органическая химия*: пер. с англ. М.: Химия, 1983. Т. 4. 728 с.
18. Кузнецов Б.Н., Кузнецова С.А., Левданский В.А., Судакова И.Г., Веселова О.Ф. Совершенствование методов выделения, изучение состава и свойств экстрактов березовой коры // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2005. Т. 13. №3. С.391–400.
19. 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.
20. Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Веселова О.Ф., Кукина Т.П., Калачева Г.С., Скворцова Г.П., Редькина Е.С. Изучение состава гексанового экстракта бересты и его токсико-фармакологических свойств // *Химия растительного сырья*. 2008. №1. С. 45–49.
21. 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.
22. Гравитис Я.А. Теоретические и прикладные аспекты метода взрывного автогидролиза // *Химия древесины*. 1987. №7. С. 3–21.
23. Кузнецова С.А., Александрова Н.Б., Кузнецов Б.Н. Состав и превращения основных компонентов автогидролизованной древесины сосны, ели и осины // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2001. Т. 9. №5. С. 655–665.

24. Практический курс анатомии растений / Под ред. В.Л. Комарова. М.: Издательство АН СССР, 1941. С. 132-133

25. Кузнецов Б.Н., Левданский В.А., Еськин А.П., Полежаева Н.И. Выделение бетулина и суберина из коры березы, активированной в условиях «взрывного автогидролиза» // Химия растительного сырья. 1998. №1. С. 5–9.

Influence of Conditions of Outer Birch Bark Acylation and Activation on the Yield and Composition of Extracts

**Svetlana A. Kuznetsova^{a,b},
Galina P. Skvortsova^a, Evgeniya S. Skurydina^a,
Yuriy N. Malyar^a and Oleg A. Hanchich^c**

^a *Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS
42 K. Marx st., Krasnoyarsk, 660049 Russia*

^b *Siberian Federal University,
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

^c *Russian State University of Tourism and Service
99, Glavnaya st., Cherkizovo, Pushkino district,
Moscow region, 141221 Russia*

It was studied the influence of conditions of outer birch bark acylation by propionic acid and activation of overheated steam on the yield and composition of triterpene derived products. It was established that depending on the acylation conditions could be obtained the extracts with different contents of betulin dipropionate, betulin monopropionate, betulin and lupeol. It was shown that the extracts with the highest contents of betulin dipropionate 85-91 % was obtained from the initial birch bark the fraction of 2-5 mm and pre-activated birch bark the fraction of 10-20 mm. The structure of betulin dipropionate was confirmed by elemental analysis, FTIR spectroscopy, PMR and C¹³ NMR.

Keywords: birch bark, acylation, propionic acid, betulin dipropionate, activation, overheated steam.
