

EDN: ZXCDQE

УДК 547.918:543.422

Mathematical Optimization of the Betulonic Acid Extraction from Bark of *Betula pendula* Roth

Vladimir A. Levdansky^a, Natalia V. Garyntseva^{*a, b},
Alexander V. Levdansky^a and Evgeniya S. Skurydina^a
^a*Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS
FRC Krasnoyarsk Science Center SB RAS
Krasnoyarsk, Russian Federation*
^b*Krasnoyarsk State Agrarian University
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 17.03.2023, received in revised form 05.04.2023, accepted 16.05.2023

Abstract. The paper describes a one-step method for obtaining betulonic acid directly from birch bark, based on the use of the Jones reagent. The influence of the duration and liquid solid ratio (LSR) of the process on the yield of betulonic acid has been studied. By the method of mathematical optimization using full factorial experiment type 3^2 and the Statgraphics Centurion XVI software package, the optimal conditions were established to ensure the yield of betulonic acid of 15.9 wt.%: duration – 3.5 h, LSR – 15. The structure of betulonic acid obtained under optimal conditions was established by methods FTIR and NMR spectroscopy, composition – by elemental analysis.

Keywords: betulonic acid, birch bark, oxidation, optimization.

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of the State task of the ICCT SB RAS FRC KSC SB RAS, project FWES-2021–0017 (registration number 121031500180–8). The equipment of the Krasnoyarsk Regional Center for Collective Use of the FRC KSC SB RAS was used in the work.

Citation: Levdansky V. A., Garyntseva N. V., Levdansky A. V., Skurydina E. S. Mathematical Optimization of the betulonic acid extraction from bark of *Betula pendula* Roth. J. Sib. Fed. Univ. Chem., 2023, 16(2), 255–265. EDN: ZXCDQE



Математическая оптимизация процесса получения бетулоновой кислоты из бересты коры *Betula pendula Roth*

В. А. Левданский^а, Н. В. Гарынцева^{а, б},
А. В. Левданский^а, Е. С. Скурыдина^а

^аИнститут химии и химической технологии СО РАН
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»

Российская Федерация, Красноярск

^бКрасноярский государственный аграрный университет
Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. В работе описан одностадийный способ получения бетулоновой кислоты непосредственно из бересты коры березы, основанный на использовании реактива Джонса. Изучено влияние продолжительности и гидромодуля процесса на выход бетулоновой кислоты. Методом математической оптимизации с использованием ПФЭ типа 3² и пакета программ Statgraphics Centurion XVI установлены оптимальные условия, обеспечивающие выход бетулоновой кислоты: 15,9 мас.%; продолжительность – 3,5 ч, гидромодуль – 15. Строение полученной в оптимальных условиях бетулоновой кислоты установлено методами ИК- и ЯМР-спектроскопии, состав – элементным анализом.

Ключевые слова: бетулоновая кислота, береста, окисление, оптимизация.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Государственного задания ИХХТ СО РАН ФИЦ КНЦ СО РАН, проект FWES-2021–0017 (номер регистрации в ЕГИСУ 121031500180–8). В работе использовано оборудование Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

Цитирование: Левданский В. А., Гарынцева Н. В., Левданский А. В., Скурыдина Е. С. Математическая оптимизация процесса получения бетулоновой кислоты из бересты коры *Betula pendula Roth*. Журн. Сиб. федер. ун-та. Химия, 2023, 16(2). С. 255–265. EDN: ZXCDQE

Введение

В настоящее время возрастает интерес в медицине и фармацевтической промышленности к биологически активным веществам растительного происхождения и медицинским препаратам, полученным в результате их химической трансформации. Соединениями, сочетающими в себе доступность с ценной биологической активностью, богат класс тритерпеноидов [1–5]. Ярким представителем этого класса соединений, широко распространенным в природе, является бетулин. Содержание бетулина во внешнем слое коры березы – бересте достигает 35 % [2]. Высокое содержание бетулина в бересте и легкость его выделения открывают широкие возможности для синтеза различных его производных, таких как сложные эфиры бетулина, аллобетулин,

бетулиновая кислота и др. [3–5]. Среди многочисленных производных бетулина бетулиновая кислота (3 β -гидрокси-луп-20(29) ен-28-овая кислота) представляет особый интерес, так как она обладает наиболее выраженной противоопухолевой активностью. Показано, что антипролиферативная активность бетулиновой кислоты в 10 раз превосходит активность известного антинеопластического препарата доксорубицина в отношении клеток меланомы человека [6] и является ингибитором роста раковых клеток [7]. Бетулиновая кислота также обладает антибактериальной, антималярийной, противовоспалительной активностью, желчегонной и другими видами активности [1, 3, 8–10].

Бетулиновая кислота, в числе лупановых тритерпеноидов, содержится в коре и листьях многих растений. Однако низкое (до 0,1 %) содержание бетулиновой кислоты в растительном сырье делает процесс её выделения малорентабельным [11]. Бетулиновую кислоту получают восстановлением бетулоновой кислоты боргидридом натрия [12], которую синтезируют окислением бетулина, выделенного из бересты.

Известные способы получения бетулоновой кислоты заключаются в окислении бетулина, выделяемого из бересты хромовым ангидридом в уксусной кислоте [12] или раствором хромового ангидрида в серной кислоте в среде ацетона (реактив Джонса) [13].

С целью уменьшения стадий получения бетулиновой кислоты в предыдущих работах [13,14] нами была оценена возможность получения бетулоновой кислоты непосредственно из бересты, совмещая в одном процессе стадию экстракции бетулина из бересты и его окисление до бетулоновой кислоты. Было установлено, что при окислении бересты хромовым ангидридом в уксусной кислоте реакционная масса в течение 5–7 мин осмоляется и выделить из неё бетулоновую кислоту не удается. При обработке бересты в ацетоне реактивом Джонса раствор приобретал желтый цвет, и легко отделялся фильтрованием от неорганических веществ и остатка бересты [13]. Также установлено, что предварительное удаление фенольных веществ из бересты 1 % раствором гидроксида натрия повышает выход бетулоновой кислоты с 15,6 до 17,5 % [13].

В настоящей работе проведена математическая оптимизация процесса получения бетулоновой кислоты непосредственно из бересты с целью определения условий процесса, обеспечивающих максимальный выход бетулоновой кислоты. Проведена идентификация, полученной в оптимальных условиях бетулоновой кислоты методами тонкослойной хроматографии, ИК- и ЯМР-спектроскопии, а также элементного анализа.

Экспериментальная часть

В качестве исходного сырья использовали внешнюю часть коры (бересту) *Betula pendula Roth.*, заготовленную в июне 2022 г. в окрестностях г. Красноярск. Бересту измельчали до частиц размером 1–3 мм и высушивали при 105 °С до влажности менее 1 %. Химический состав бересты (% мас.): тритерпены 34.7 (из них 30.0 бетулин), суберин 40.3, лигнин 13.5, целлюлоза 3.8, зола 2.3.

Получение бетулоновой кислоты (3-оксилуп-20(29)-ен-28-овая кислота) из бересты

В четырехгорлую колбу объемом 1 л, снабженную мешалкой, термометром, обратным холодильником и капельной воронкой, загружали 25 г бересты, измельченной до частиц размером 1–3 мм, и заливали ацетоном. При интенсивном перемешивании медленно прибавляли све-

жеприготовленный реактива Джонса, варьируя соотношение ацетон: береста (ГМ) от 12 до 16, и перемешивали при температуре 20 °С в течение 1,5–3,5 ч. Реактив Джонса получали растворением 3,4 г CrO_3 в 2,9 мл 98 % H_2SO_4 и последующим разбавлением водой до объема 12,5 мл. После окончания реакции реакционную массу отфильтровывали от солей хрома и остатка бересты. Затем полученный фильтрат концентрировали в вакууме, остаток разбавляли 150 мл H_2O , образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали на фильтре дистиллированной водой и сушили. Для очистки сухой осадок растворяли в 80 мл бензола, добавляли активированный уголь, фильтровали через слой 5 мм Al_2O_3 и обрабатывали 10 %-ным раствором КОН до полного осаждения калиевой соли бетулоновой кислоты, которую отфильтровывали, промывали на фильтре 15–20 мл бензола и высушивали при комнатной температуре до постоянного веса. Затем растворяли в 30 мл этанола и раствор выливали в стакан, содержащий 100 мл 10 % HCl . Выпавший осадок бетулоновой кислоты отфильтровывали, промывали H_2O , сушили и очищали перекристаллизацией из CH_3OH .

Регистрацию ИК-спектров поглощения осуществляли на ИК-Фурье спектрометре Shimadzu IR Tracer 100. ИК-спектры бетулоновой кислоты регистрировали в области длин волн 400–4000 cm^{-1} . Образцы для съемки готовили прессованием с бромидом калия (3 мг образца / 300 мг KBr). Обработку спектральной информации проводили с применением пакета программ OPUS, версия 5.0.

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker Avance III 600 МГц в CD_3OD , 0 – TMS.

Элементный анализ выполняли на элементном анализаторе Flash EATM–1112 (Thermo Quest Italia), одновременно определяющем количество (в %) С и Н.

Измерение $T_{пл}$ проводили на приборе Electrothermal A9100. ТСХ-анализ проводили на пластинках Silufol (Chemapol, Чехия), используя систему растворителей хлороформ–метанол–муравьиная кислота (100: 2: 0,5). Вещество обнаруживали 20 %-ным раствором фосфорновольфрамовой кислоты в этаноле с последующим нагреванием при 100–200 °С в течение 2–3 мин, а также в парах I_2 .

Результаты и обсуждение

Схема получения бетулоновой кислоты из бересты коры березы представлена на рис. 1. В одной стадии совмещен процесс экстракции бетулина из бересты коры березы и процесс его окисления до бетулоновой кислоты с использованием реактива Джонса.

Было изучено влияние гидромодуля (соотношение ацетон: береста) и продолжительности процесса получения на выход бетулоновой кислоты. Другие параметры, которые могут оказывать влияние на выход продукта, – температура и количество реактива Джонса – были постоянными, согласно условиям использования реактива Джонса [15].

Продолжительность процесса получения бетулоновой кислоты из бересты коры березы варьировали от 1,5 до 3,5 ч, гидромодуль от 12 до 16. Результаты представлены на рис. 2. Зависимость выхода бетулоновой кислоты от времени в интервале 1,5–2,5 ч, независимо от гидромодуля, имеет практический линейный характер, а после 2,5 ч выходит на плато (рис. 2). При гидромодулях 10 и 12 выход бетулоновой кислоты (через 3,5 ч) составляет 12,3 и 13,3 мас.% соответственно. Увеличение гидромодуля приводит к увеличению выхода бетулоновой

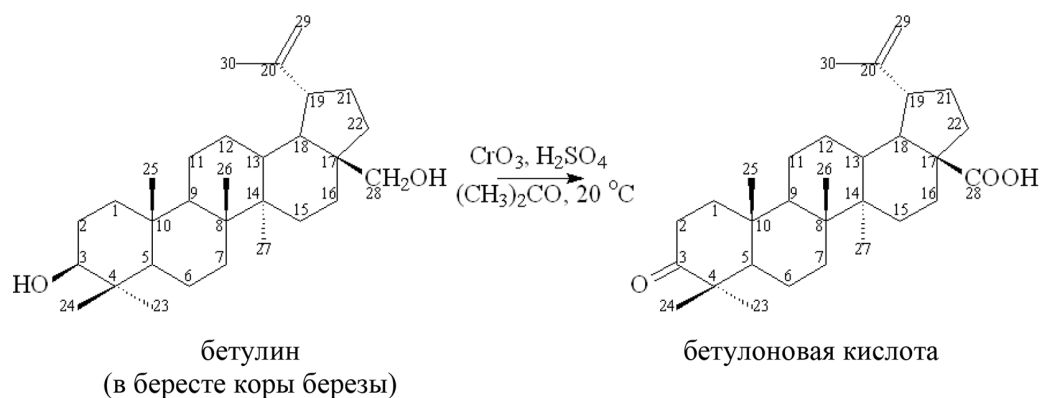


Рис. 1. Схема получения бетулоновой кислоты из бересты коры березы с использованием реактива Джонса

Fig. 1. Scheme for obtaining betulonic acid from birch bark using the Jones reagent

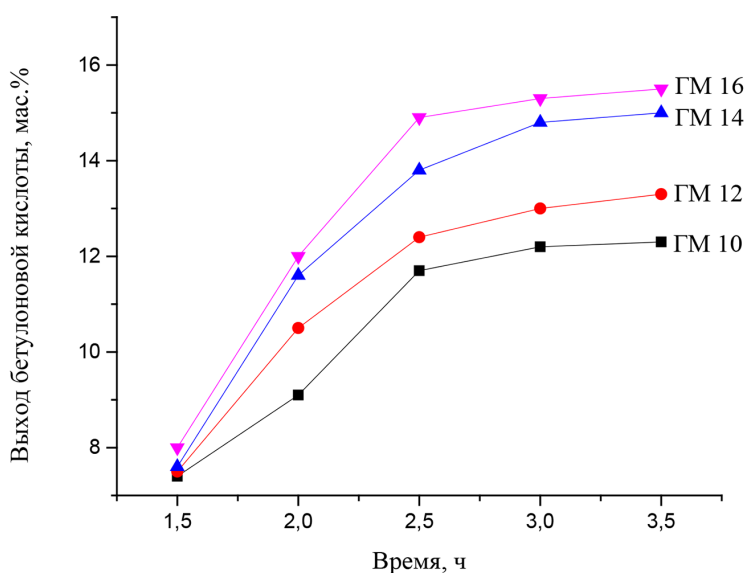


Рис. 2. Зависимость выхода бетулоновой кислоты от продолжительности процесса её получения из бересты коры березы

Fig. 2. Dependence of the yield of betulonic acid on the duration of the process of its production from birch bark

кислоты, но при этом для гидромодуля 14 и 16 наблюдаются сопоставимые значения выхода: 15,0–15,5 мас.% после 3–3,5 ч реакции.

Для определения оптимальных условий получения бетулоновой кислоты из бересты коры березы была проведена математическая оптимизация процесса с использованием ПФЭ типа 3^2 и пакета программ Statgraphics Centurion XVI [16].

В качестве переменных факторов использовали: X_1 – продолжительность процесса, ч. X_2 – гидромодуль процесса. Выходной параметр оптимизации: Y – выход бетулоновой кислоты, мас.%. Фиксированный параметр – температура 20 °С. В матрице планирования экс-

перимента (табл. 1) независимые переменные представлены в натуральных и кодированных единицах.

Оптимизация процесса получения бетулоновой кислоты из бересты коры березы сводится к поиску в пределах изученного факторного пространства условий, обеспечивающих её максимальный выход: $Y \rightarrow \max$. Ограничения области поиска решения в факторном пространстве установлены на основании предварительных экспериментов (рис. 2) и составляют $1,5 \leq X_1 \leq 3,5$, $12 \leq X_2 \leq 16$.

Вклад переменных факторов процесса на выходной параметр – выход бетулоновой кислоты представлен на рис. 3 в виде стандартизованной карты Парето. Полученные результаты свидетельствуют о том, что статистически значимые эффекты имеют оба фактора: продолжительность (фактор X_1) и гидромодуль (фактор X_2), их столбцы пересекают синюю вертикальную линию, соответствующую тесту на значимость с уровнем доверия 95 %. Преобладающий вклад вносит фактор продолжительности процесса (X_1) получения бетулоновой кислоты (рис. 3).

Таблица 1. Матрица планирования эксперимента и результаты её реализации

Table 1. Matrix of experiment planning and results of its implementation

| № | Натуральные переменные | | Кодированные переменные | | Выходной параметр Y – выход бетулоновой кислоты, мас. %. | | | |
|---|------------------------|-------------|-------------------------|-------|---|-------|-------|-------------|
| | X_1 t, ч | X_2 ГМ | X_1 | X_2 | Y_1 | Y_2 | Y_3 | Y_{cp} |
| 1 | 1,5 | 12 | -1,0 | -1,0 | 7,4 | 7,4 | 7,7 | 7,5 |
| 2 | 2,5 | 12 | 0,0 | -1,0 | 12,6 | 12,4 | 12,2 | 12,4 |
| 3 | 3,5 | 12 | 1,0 | -1,0 | 13,6 | 13,1 | 13,2 | 13,3 |
| 4 | 1,5 | 14 | -1,0 | 0,0 | 7,5 | 7,9 | 7,4 | 7,6 |
| 5 | 2,5 | 14 | 0,0 | 0,0 | 13,8 | 13,5 | 14,1 | 13,8 |
| 6 | 3,5 | 14 | 1,0 | 0,0 | 14,7 | 15,1 | 15,2 | 15,0 |
| 7 | 1,5 | 16 | -1,0 | 1,0 | 8,2 | 7,7 | 8,1 | 8,0 |
| 8 | 2,5 | 16 | 0,0 | 1,0 | 14,6 | 14,7 | 15,4 | 14,9 |
| 9 | 3,5 | 16 | 1,0 | 1,0 | 15,3 | 15,4 | 15,8 | 15,5 |

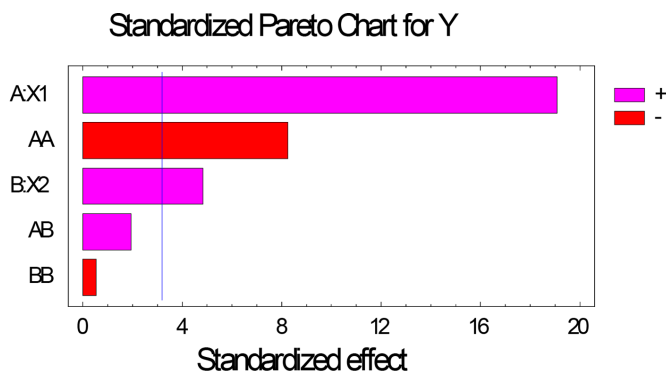


Рис. 3. Стандартизованная карта Парето

Fig. 3. Standardized Pareto Chart

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа выходного параметра Y

Table 2. Results of the analysis of variance of the output parameter Y

| Источники дисперсии | Коэффициенты регрессии | Эффективность F-Ratio | Уровень значимости P-Value |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Constant | 13,811 | | |
| X ₁ | 3,433 | 364,61 | 0,0003 |
| X ₂ | 0,866 | 23,23 | 0,0170 |
| X ₁ ² | -2,566 | 67,92 | 0,0037 |
| X ₁ X ₂ | 0,425 | 3,72 | 0,1492 |
| X ₂ ² | -0,166 | 0,29 | 0,6247 |
| R ² ,% | | 98,2 | |

Распределение влияния факторов подтверждают результаты дисперсионного анализа (табл. 2), именно эти факторы имеют уровень значимости менее 0,05 (столбец P-Value).

В результате математической обработки результатов получены уравнения регрессии, адекватно описывающие данную модель с доверительной вероятностью 98,2 %:

В кодированных переменных:

$$Y = 13,81 + 3,43X_1 + 0,87X_2 - 2,56X_1^2 + 0,43X_1X_2 - 0,17X_2^2 \quad (1)$$

В натуральных переменных:

$$Y = -19,1583 + 13,225X_1 + 1,30208X_2 - 2,55X_1^2 + 0,2125X_1X_2 - 0,05X_2^2 \quad (2)$$

Поверхность отклика, соответствующая уравнению (2), изображена на рис. 4. Прогнозируемый выход бетулоновой кислоты (≥ 15 мас.%) при её получении из бересты коры березы в изученной области факторного пространства достигается в интервале значений гидромодуля 14,3–16,0 и продолжительности 2,7–3,5 ч (темно-зеленая область на рис. 4).

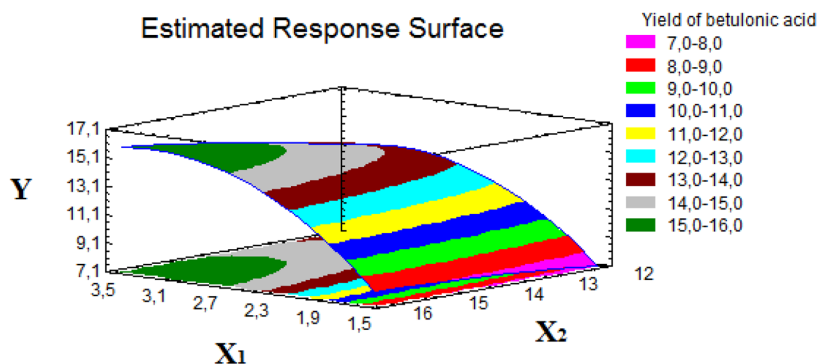


Рис. 4. Поверхность отклика выходного параметра – выхода бетулоновой кислоты (Y) от переменных факторов процесса: продолжительности (X₁) и гидромодуля (X₂)

Fig. 4. The response surface of the output parameter – the yield of betulonic acid (Y) on the variable factors of the process: duration (X₁) and LSR (X₂)

Рассчитанная точка оптимума, в которой выход бетулоновой кислоты равен 15,9 мас.% соответствует следующим значениям переменных факторов: гидромодуль – 15, продолжительность – 3,5 ч.

Бетулоновая кислота, полученная в оптимальных условиях, была исследована различными методами анализа.

Температура плавления бетулоновой кислоты составляет 245–248 °С. Состав бетулоновой кислоты подтвержден элементным анализом. Найдено (%): С 79.51–80.11; Н 9.73–9.97; О 10.31–10.72. Вычислено (%): С 79.30; Н 10.13; О 10.57.

Строение бетулоновой кислоты подтверждено методами ИК- и ЯМР-спектроскопии. В ИК-спектре бетулоновой кислоты (рис. 5), в отличие от ИК-спектра бетулина, отсутствует полоса поглощения спиртового гидроксила в области 3500 см⁻¹. В области 1688 и 1704 см⁻¹ присутствуют плохо разрешимые полосы поглощения карбоксила и кетогруппы. В области 3000–2800 см⁻¹ присутствует широкая полоса, соответствующая колебаниям ОН карбоксильной группы. ИК-спектр полученной бетулоновой кислоты идентичен приведенному в работе [17].

В ¹H ЯМР-спектре бетулоновой кислоты (рис. 6) в интервале 0.97–1.72 м.д. наблюдаются шесть синглетов, соответствующих метильным протонам. Наличие сигналов двух протонов концевой двойной связи (4.62 и 4.74 м.д.) свидетельствует об устойчивости двойной связи изопренового фрагмента к окислению в выбранных условиях. В области 3.05 м.д. присутствует сигнал метинового протона при С19, а в области 3.75–3.85 м.д. отсутствует сигнал протона при С3, характерный для бетулина.

В спектре ¹³C ЯМР бетулоновой кислоты наблюдается сигнал атома углерода С3-оксогруппы в области 219.4 м.д. и сигнал атома углерода С28 карбоксильной группы в области

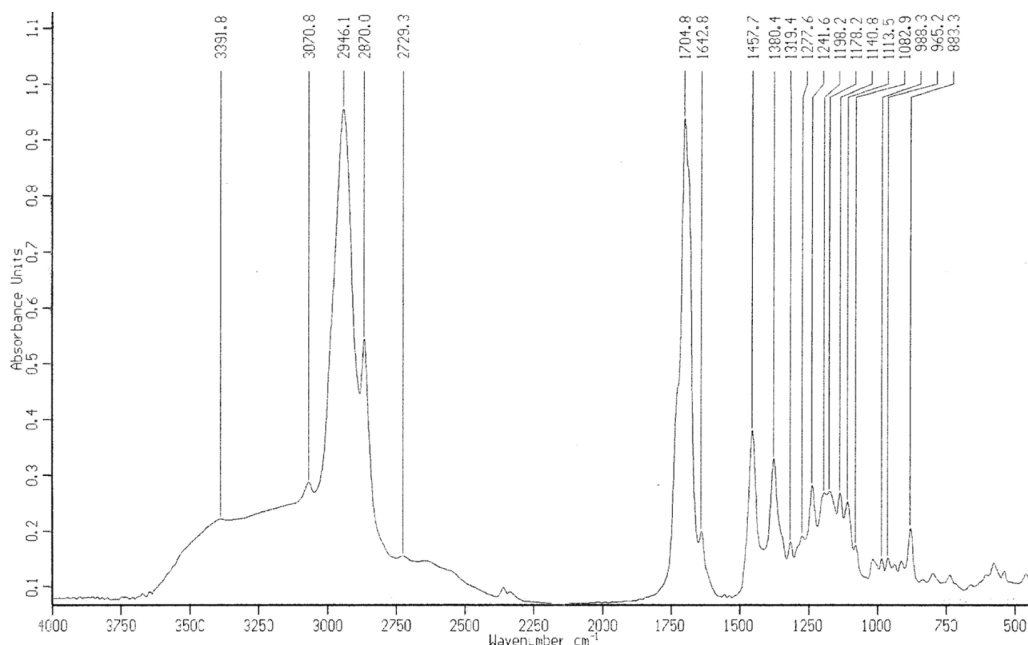


Рис. 5. ИК-спектр бетулоновой кислоты

Fig. 5. FTIR spectrum of betulonic acid

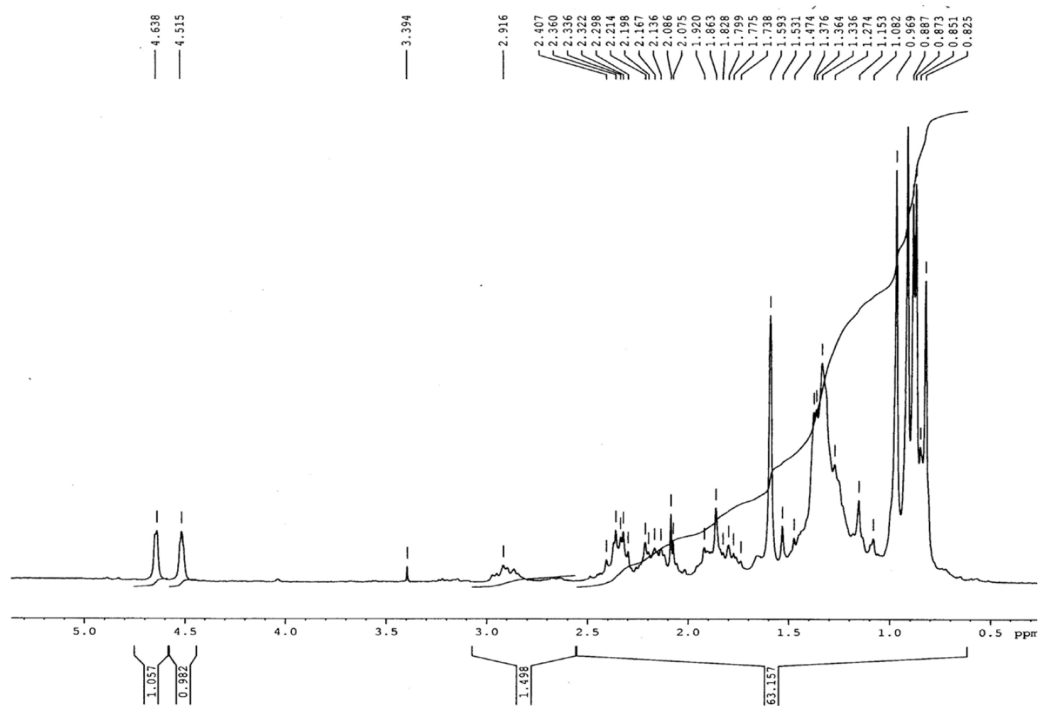


Рис. 6. ^1H ЯМР-спектр бетулоновой кислоты

Fig. 6. ^1H NMR spectrum of betulonic acid

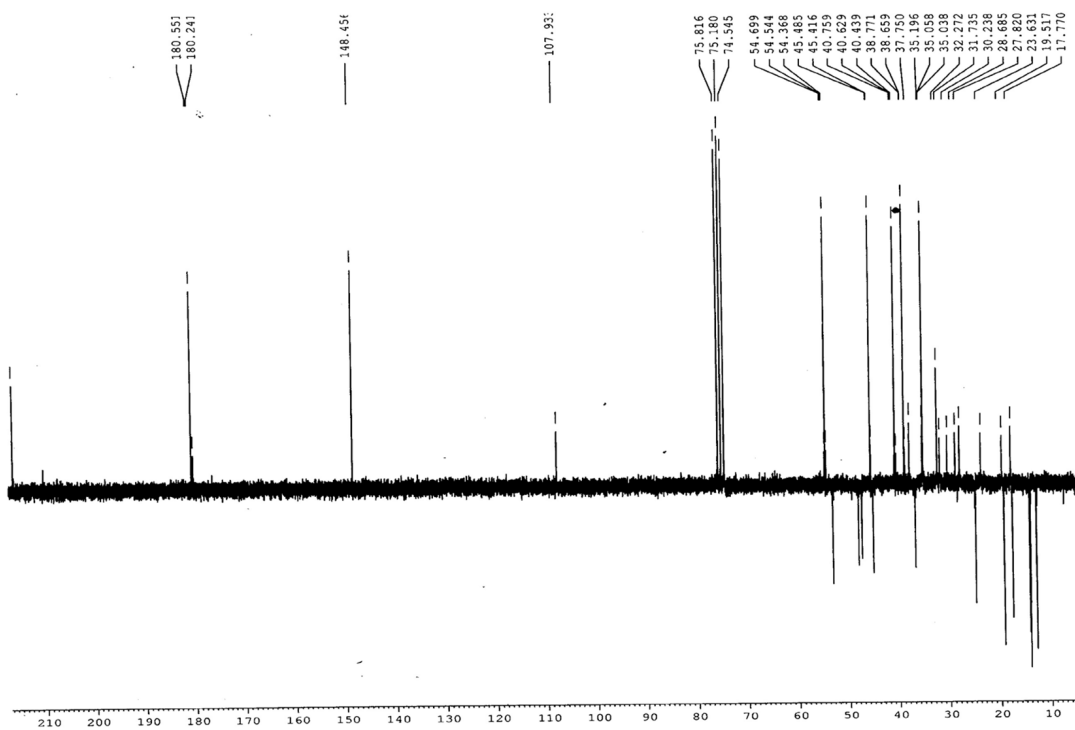


Рис. 7. ^{13}C ЯМР-спектр бетулоновой кислоты

Fig. 7. ^{13}C NMR spectrum of betulonic acid

178.5 м.д. (рис. 7). Доказательством того, что при превращении бетулина в бетулоновую кислоту двойная связь в изопреновом фрагменте остается в неизменном виде, служит наличие с ^{13}C ЯМР-спектре бетулоновой кислоты сигналов ^{13}C (δ м.д.): 150.5 (C20), 108.6 (C29), 19.3 (C30), что соответствует литературным данным [18].

Заключение

Изучено влияние продолжительности и гидромодуля процесса на выход бетулоновой кислоты при её получении непосредственно из бересты коры березы, исключая предварительную стадию выделения бетулина. Методом математической оптимизации получены уравнения регрессии (в кодированных и натуральных переменных), адекватно описывающие модель с доверительной вероятностью 98,2 %. Определены оптимальные условия получения бетулоновой кислоты непосредственно из бересты коры березы с выходом 15,9 мас.‰: продолжительность 3,5 ч, гидромодуль 15.

Состав полученной бетулоновой кислоты подтвержден методом элементного анализа, строение – методами ИК- и ЯМР-спектроскопии.

Список литературы / References

- [1] Толстикова Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстикова А.Г. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность. *Химия в интересах устойчивого развития 2005*. 13, 1–30. [Tolstikova G. A., Flekhter O. B., Shults E. E., Baltina L. A., Tolstikova A. G. Betulin and its derivatives. Chemistry and biological activity. *Chemistry for Sustainable Development 2005*. 13, 1–30 (In Russ.)]
- [2] Кузнецов Б.Н., Левданский В.А., Кузнецова С.А. *Химические продукты из древесной коры*. Красноярск: Сиб. федер. ун-т. 2012. 260 [Kuznetsov B. N., Levdansky V. A., Kuznetsova S. A. *Chemical products from tree bark*. Krasnoyarsk: Sib. Feder. Un-t. 2012. 260 (In Russ.)]
- [3] Воробьева О.А., Малыгина Д.С., Грубова Е.В., Мельникова Н.Б. Производные бетулина. Биологическая активность и повышение растворимости. *Химия растительного сырья 2019*. 4, 407–430. [Vorobyeva O. A., Malygina D. S., Grubova E. V., Melnikova N. B. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya 2019*, 4, 407–430. (In Russ.)]
- [4] Bildziukevich U., Özdemir Z., Wimmer Z. Recent achievements in medicinal and supramolecular chemistry of betulinic acid and its derivatives. *Molecules 2019*. 24, 3546.
- [5] Amiri Sh., Dastghaib S., Ahmadi M., Mehrbod P. et.al. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects. *Biotechnology Advances 2020*. 38, 107409.
- [6] Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L. et.al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Letter 2002*. 175(1), 17–25.
- [7] Patent 5962527 US. Pezzuto J.M., Das Gupta T.K., Schmidt M.L., Kuzmanoff K.M. et al. *Method and Composition for treating cancers*. 1999.
- [8] Спивак А.Ю., Недопекина Д.А., Шакурова Э.Р., Халитова Р.Р. и др. Синтез лупановых тритерпеноидов с трифенилфосфониевыми фрагментами и изучение их противоопухолевой активности. *Известия АН, Серия химическая 2013*. 1, 189. [Spivak A. Yu., Nedopekina D. A., Shakurova E. R., Khalitova R. R. Synthesis of lupane triterpenoids with triphenylphosphonium fragments and study of their antitumor activity. *Russian Chemical Bulletin 2013*. 1, 189. (In Russ.)]

[9] Hordyjewska A., Ostapiuk A., Horecka A., Kurzepa J. Betulin and betulinic acid: Triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. *Phytochem Rev* 2019. 8, 929–951.

[10] Кузнецов Б.Н., Левданский А.В., Кузнецова С.А., Когай Т.И. Синтез биологически активных тритерпеновых соединений на основе бетулина. *Журнал СВУ. Химия* 2011. 4(4), 408–423. [Kuznetsov B. N., Levdansky A. V., Kuznetsova S. A., Kogay T. I. Synthesis of biologically active betulin-based triterpene compounds. *Journal of Siberian Federal University. Chemistry* 2011. 4(4), 408–423. (In Russ.)]

[11] Levdanskii V.A., Levdanskii A. V., Kuznetsov B. N. Sulfonation of betulinic acid by sulfamic acid. *Chemistry of Natural Compounds* 2015. 51, 894–896.

[12] Ле Банг Шон, Каплун А.П., Шпилевский А.А., Андия-Правдивый Ю.Э., Алексеева С.Г., Григорьев В.Б., Швец В.И. Синтез бетулиновой кислоты из бетулина и исследование её солюбилизации с помощью липосом. *Биоорганическая химия* 1998. 24(10), 787–793. [Le Bang Son, Kaplun A. P., Shpilevskii A. A., Andiya-Pravdivyi Yu. E., Alekseeva S. G., Grigorev V. B., Shvets V. I. The synthesis of betulinic acid from betulin and its solubilization with liposomes. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 1998. 24(10), 787–793. (In Russ.)]

[13] Levdanskii V.A., Levdanskii A. V., Kuznetsov B. N. Method for preparing betulonic acid from *Betula pendula* birch bark. *Chemistry of Natural Compounds* 2015. 52(4), 766–768.

[14] Патент 2580106 РФ. Левданский А.В., Левданский В.А., Кузнецов Б.Н. Способ получения бетулоновой кислоты. Оpubл. 10.04.2016. Бюл. № 10. [Patent 2580106 RU. Levdansky A. V., Levdansky V. A., Kuznetsov B. N. Method for producing betulonic acid. Published 04.10.2016. Bull. No. 10.]

[15] Melnikova N, Burlova I, Kiseleva T, Klabukova I, Gulenova M, Kislitsin A, Vasin V, Tanaseichuk B. A Practical Synthesis of Betulonic Acid Using Selective Oxidation of Betulin on Aluminium Solid Support. *Molecules* 2012. 17(10), 11849–11863.

[16] Пен Р.З. Планирование эксперимента в Statgraphics Centurion. Красноярск, 2014. 292 [Pen R. Z. Planning an experiment in Statgraphics Centurion. Krasnoyarsk, 2014. 292 (In Russ.)]

[17] Ledeti I., Avram S., Bercean V. et al. Solid-State Characterization and Biological Activity of Betulonic Acid Derivatives. *Molecules* 2015. 20(12), 22691–22702.

[18] Barthel A., Stark S, Csuk R. Oxidative transformations of betulinol. *Tetrahedron* 2008. 64(39), 9225–9229.