

УДК 54.05

## **Влияние природы органического растворителя на экстракционное выделение бетулина из бересты коры березы**

**В.А. Левданский<sup>а,б</sup>, И.В. Королькова<sup>а</sup>,  
А.В. Левданский<sup>а</sup>, Н.М. Иванченко<sup>а</sup>, Б.Н. Кузнецов<sup>а,б\*</sup>**

<sup>а</sup> *Институт химии и химической технологии СО РАН,  
Россия 660036 Красноярск, Академгородок, 50-24*

<sup>б</sup> *Сибирский федеральный университет,  
Россия 660041 Красноярск, Свободный, 79<sup>1</sup>*

Received 10.09.2012, received in revised form 17.09.2012, accepted 24.09.2012

*Изучена экстракция бересты березы в аппарате Сокслета гексаном, петролейным эфиром, бензином БР-1, циклогексаном, ацетонитрилом, диэтиловым эфиром, этилацетатом, ацетоном, изопропанолом, этанолом и 1,4-диоксаном. Проведено сравнительное изучение полученных экстрактов методом ИК-спектроскопии. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) определено содержание бетулина и бетулиновой кислоты в экстрактах, выделенных после их концентрирования до 1/4 первоначального объема, и в экстрактах после полного удаления растворителя. Установлено, что использование полярных растворителей позволяет получать экстракты с выходом до 28,8 %, содержащих от 90 до 95 % бетулина.*

*Ключевые слова: гексан, петролейный эфир, бензин БР-1, циклогексан, ацетонитрил, диэтиловый эфир, этилацетат, ацетон, изопропанол, этанол, 1,4-диоксан, экстракт, бетулин, бетулиновая кислота.*

### **Введение**

В известных работах для извлечения бетулина из бересты используют лишь ограниченное число растворителей [1, 2]. В работе [3] изучена скорость экстракции бетулина методом настаивания бересты мелкого помола (размер частиц 0,15-1,5 мм) в следующих растворителях – дихлорметане, метаноле, изопропанол, этаноле, 2-бутаноле и углеводородном растворителе LIAV-200 при температуре экстракции 150 °С. Показано, что извлекается от 75 до 95 % бетулина от содержащегося в бересте.

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

<sup>1</sup> © Siberian Federal University. All rights reserved

Основной недостаток экстракционных методов получения бетулина заключается в том, что из бересты попутно с бетулином и различными тритерпеноидами извлекаются и другие классы соединений. Причем с увеличением температуры кипения и полярности растворителя общий выход экстракта увеличивается, а доля бетулина в нем снижается [3].

Однако, несмотря на указанный недостаток, экстракционные методы выделения бетулина из бересты привлекают исследователей простотой технологического исполнения и возможностью регенерации и многократного использования растворителей. В последнее десятилетие запатентован ряд способов выделения бетулина с использованием как неполярных углеводородов гексана [4], толуола [5], уайт-спирита [6], смеси неполярных растворителей, например смесь толуола с петролевым эфиром [7], так и полярных растворителей – этанола и других спиртов [8].

В данной работе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проведен анализ экстрактов, выделенных из бересты группой органических растворителей различной природы. Определено содержание бетулина и бетулиновой кислоты в экстрактах, полученных после их концентрирования до 1/4 первоначального объема, и в экстрактах, полученных после полного удаления растворителя. Методом ИК-спектроскопии проведено сравнительное изучение этих экстрактов.

### Экспериментальная часть

В качестве исходного сырья использовали внешнюю часть коры березы – бересту *Betula pendula Roth.*, заготовленную в октябре 2010 г. в окрестностях г. Красноярска. Бересту измельчали и отбирали фракцию размером от 1 до 2 мм, высушивали при 105 °С до влажности менее 1 %. Содержание основных компонентов в бересте (в % к а.с. бересте): экстрактивные вещества – 44,2 % (из них 34,0 % бетулин); суберин – 35,3 %; лигнин – 13,2 %; целлюлоза – 5,9 %; зола 1,2 %.

ИК-спектры выделенных из бересты экстрактов, эталонных образцов бетулина и бетулиновой кислоты сняты на Фурье ИК-спектрометре Vector – 22 фирмы Bruker в области длин волн 400–4000 см<sup>-1</sup> в таблетках KBr (3 мг образца / 300 мг KBr). Элементный анализ эталонных образцов бетулина и бетулиновой кислоты выполнен на элементном анализаторе Flash EA™ –1112 (Thermo Quest Italia), одновременно определяющем количество (в %) углерода, водорода и серы, а также кислорода.

Экстракты, выделенные из бересты экстракцией каждым из растворителей, исследованы методом ВЭЖХ с использованием жидкостного хроматографа «Милихром А-02» со спектрофотометрическим сканирующим детектором УФ-диапазона на колонке из нержавеющей стали (2,0 × 75 мм), упакованной силикагелем с размером зерна 5,0 мкм, типа Prontosil C 18 AQ. Температура колонки (35,0 ± 0,3) °С. Подвижная фаза ацетонитрил – деионизированная вода в соотношении 86:14, скорость подачи элюента 200 мкл/мин. Концентрация анализируемых образцов бетулина в этиловом спирте составляла 0,8–1,0 мг/мл. Дозируемый объем раствора исследуемого вещества 4 мкл. Обработка полученных результатов осуществлялась программой «МультиХром-СПЕКТР» для Windows (Ampersand Ltd). Время регистрации хроматограммы 7,5 мин. Хроматографические пики бетулина и бетулиновой кислоты идентифицированы по времени удерживания и спектральным от-

ношениям относительно канала 210 нм. Время выхода бетулиновой кислоты 2,90 мин, а бетулина – 3,61 мин.

Экстракцию измельченной бересты с влажностью менее 1 % проводили в аппарате Сокслета объемом 300 мл (приемная колба 1000 мл). Температура кипения основных растворителей составляла менее 100 °С. Во всех экспериментах объем используемого растворителя был 500 мл, а количество бересты (размер частиц 1-2 мм) равнялось 40,00 г. Продолжительность экстракции составляла 10 ч. После 10-часовой экстракции раствор экстрактивных веществ упаривали до 1/4 первоначального объема (до 120-125 мл), охлаждали до 15 °С и выдерживали при этой температуре в течение 24 ч. Фильтрацией отделяли выпавший осадок от маточного раствора, высушивали, определяли его выход и анализировали методом ВЭЖХ. Маточный раствор, объем которого составляет 115-120 мл, концентрировали под вакуумом до полного удаления растворителя. Определяли выход сухого остатка и содержание в нём бетулина и бетулиновой кислоты.

Эталонный образец бетулина был получен по методике, приведенной в работе [9]. Окисление бетулина в бетулоновую кислоту проводили хромовым ангидридом в уксусной кислоте по методике, описанной в работе [10]. Восстанавливали бетулоновую кислоту в бетулиновую боргидридом натрия в тетрагидрофуране [11].

### Результаты и обсуждение

Изучено извлечение бетулина из бересты в аппарате Сокслета с использованием органических растворителей различной полярности. В группу полярных растворителей для извлечения экстрактивных веществ и бетулина вошли этанол, изопропанол, ацетон и диоксан. Расширена группа неполярных растворителей – использованы бензин, гексан, петролейный эфир и циклогексан, а также проведена экстракция бересты растворителями, обладающими средней полярностью – диэтиловым эфиром, ацетонитрилом и этилацетатом. В табл. 1 приведены данные о выходе экстрактивных веществ, выделенных из бересты после концентрирования экстрактов до 1/4 первоначального объема и полного удаления растворителя.

Как видно из данных табл. 1, при экстракции бересты неполярными растворителями – гексаном, петролейным эфиром и бензином БР-1 – из нее извлекается от 7 до 13 % экстрактивных веществ, причем помимо бетулина извлекаются хорошо растворимые в этих растворителях жиры, жирные кислоты, воска и стерины. При частичной отгонке растворителя – концентрирования экстрактов до 1/4 первоначального объема – бетулин как наиболее плохо растворимый компонент экстракта в первую очередь кристаллизуется и выпадает в осадок. При этом хорошо растворимые побочные вещества остаются в растворе. Это позволяет существенно увеличить концентрацию бетулина в выделяемых экстрактах. Наиболее эффективным из неполярных растворителей, используемых для экстракции бересты, является циклогексан. Выход извлекаемых им экстрактивных веществ составляет 28,5 %.

Экстракция бересты растворителями, обладающими средней полярностью – ацетонитрилом, диэтиловым эфиром и этилацетатом, позволяет извлекать соответственно 29,5, 35,8 и 38,0 % экстрактивных веществ. Установлено, что при концентрировании этих экстрактов до 1/4 первоначального объема выделяется 23,8, 26,8 и 23,8 % экстрактивных веществ, причем доля

Таблица 1. Выход экстрактивных веществ при обработке бересты различными растворителями

№ п/п	Растворитель	Выделено после концентрирования р-ра до 1/4 первоначального объема (фракция 1)		Дополнительно выделено после полного удаления растворителя (фракция 2)		Общий выход экстрактивных веществ		T <sub>кип</sub> раство- рителя °С
		г	%	г	%	г	%	
1	Гексан	1,8	4,5	1,0	2,5	2,8	7,0	68,7
2	Петролейный эфир	4,2	10,5	1,0	2,5	5,2	13,0	40-70
3	Бензин БР-1	2,8	7,0	1,3	3,2	4,1	10,2	87-98
4	Циклогексан	10,5	26,2	0,9	2,3	11,4	28,5	81,0
5	Ацетонитрил	9,5	23,8	2,3	5,7	11,8	29,5	81,6
6	Диэтиловый эфир	10,7	26,8	3,6	9,0	14,3	35,8	34,5
7	Этилацетат	9,5	23,8	5,7	14,2	15,2	38,0	77,2
8	Ацетон	9,8	24,5	5,5	13,8	15,3	38,3	56,2
9	Изопропанол	11,2	28,0	4,1	10,2	15,3	38,2	82,2
10	Этанол	11,5	28,8	4,9	12,2	16,4	41,0	78,3
11*	Диоксан	9,6	24			9,6	24,0	101,3

\* После отгона диоксана полностью при 50 °С под вакуумом маслообразный остаток разбавили холодной водой и отфильтровали.

веществ, остающихся в растворе после концентрирования, увеличивается с 5,7 % для ацетонитрила до 9,0 и 14,2 % соответственно для эфирного и этилацетатного экстрактов.

Экстракция бересты полярными растворителями – ацетоном, изопропанолом и этанолом – позволяет извлекать от 38,3 до 41,0 % экстрактивных веществ. После концентрирования этих экстрактов выделяется из ацетонового 24,5 %, изопропанольного 28,0 % и этанольного 28,8 % экстрактивных веществ. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, с увеличением полярности растворителя наряду с увеличением выхода экстрактивных веществ увеличивается и доля веществ, остающихся в растворе после концентрирования полученных экстрактов, с 2,5-3,2 для неполярных растворителей и до 13,0-14,0 – для полярных.

Как показано выше, при одинаковой продолжительности экстракции (10 ч) увеличение общего выхода экстрактивных веществ из бересты происходит при её экстракции полярными растворителями. Так, при переходе от ацетонитрила к этилацетату, ацетону и более полярным растворителям – спиртам – общий выход экстрактивных веществ увеличивается до 41 %. Однако экстракция полярным растворителем приводит к извлечению из бересты большой группы фенольных и полифенольных веществ. В результате при переходе от неполярных к более полярным растворителям внешний вид экстракта из светло-желтого становится коричневым.

Методом ВЭЖХ определено содержание бетулина и бетулиновой кислоты в осадках, выделенных после концентрирования полученных экстрактов до 1/4 первоначального объема, и в осадках, полученных после полного удаления растворителей (табл. 2).

Установлено, что концентрирование изопропанольного и этанольного экстрактов до 1/4 первоначального объема приводит к выделению осадков, содержащих 88,4 и 89,6 % бетулина,

Таблица 2. Результаты анализа методом ВЭЖХ экстрактов выделенных из бересты

№ образца	Растворитель	Фракция*	Выход. %**	Содержание бетулина, %***	Содержание бетулиновой кислоты, %	Общий выход экстракта, %**	Содержание бетулина в объединенном осадке, %***
1	Гексан	1	4,5	73,2	3,4	7,0	53,2
		2	2,5	17,0	-		
2	Петролейный эфир	1	10,5	90,4	4,5	13,0	74,8
		2	2,5	9,0	-		
3	Бензин БР-1	1	7,0	84,5	3,3	10,2	62,0
		2	3,2	16,4	1,0		
4	Циклогексан	1	26,2	75,4	3,3	28,5	70,2
		2	2,3	8,5	1,0		
5	Ацетонитрил	1	23,8	74,4	8,3	29,5	62,5
		2	5,7	-	-		
6	Диэтиловый эфир	1	26,8	84,3	7,3	35,8	72,9
		2	9,0	39,1	6,8		
7	Этилацетат	1	23,8	95,5	8,1	38,0	74,3
		2	14,2	39,0	3,9		
8	Ацетон	1	24,5	90,6	9,0	38,3	71,0
		2	13,8	36,1	4,9		
9	Изопропанол	1	28,0	88,4	4,9	38,2	69,2
		2	10,2	16,6	6,6		
10	Этанол	1	28,8	89,6	7,1	41,0	72,5
		2	12,2	33,4	4,1		
11	Диоксан		24,0	64,0	6,7	24,0	64,0

\* Фракция 1 выделена после концентрирования раствора до 1/4 первоначального объема; фракция 2 дополнительно выделена после полного удаления растворителя; \*\* от массы а.с. бересты; \*\*\* от массы сухого экстракта.

а ацетонового и этилацетатного экстрактов – 90,6 и 95,5 % бетулина. Методом ВЭЖХ показано, что из бересты наряду с бетулином извлекается и бетулиновая кислота, её выход для неполярных растворителей составляет 3-4 %, а для полярных – 8-9 %. Наличие бетулина и бетулиновой кислоты в экстрактах подтверждено сравнением их физико-химических характеристик с характеристиками эталонных образцов бетулина и бетулиновой кислоты, полученных известным способом.

Методом ИК-спектроскопии проведено сравнительное изучение веществ, выделенных из экстрактов после их концентрирования до 1/4 первоначального объема (1-я фракция), с соответствующими осадками, полученными после полного удаления остатка растворителя (2-я фракция) (рис. 1-10).

Как видно из рис. 1-10, ИК-спектры первых фракций, выделенных из бересты неполярными растворителями – гексаном, петролейным эфиром, бензином и циклогексаном (рис. 1-4) и полярными – этилацетатом, ацетоном, этанолом и изопропанолом (рис. 6-10) – очень близки и имеют все характерные для бетулина полосы поглощения, приведенные в работе [4]. ИК-спектры вторых фракций, полученных после полного испарения неполярных растворителей,

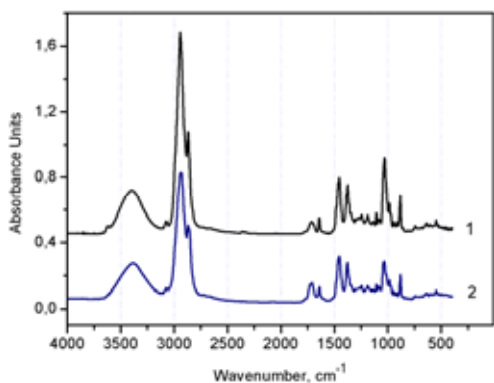


Рис. 1. ИК-спектр гексанового экстракта бересты: 1 – фракция 1, 2 – фракция 2

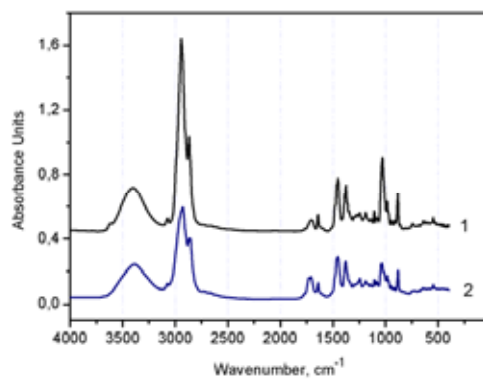


Рис. 2. ИК-спектр экстракта бересты петролейным эфиром

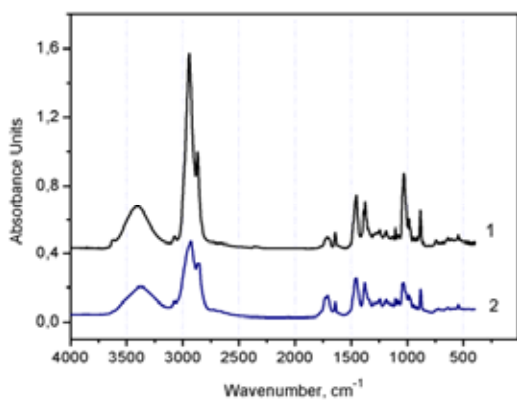


Рис. 3. ИК-спектр бензинового (БР) экстракта бересты: 1 – фракция 1, 2 – фракция 2

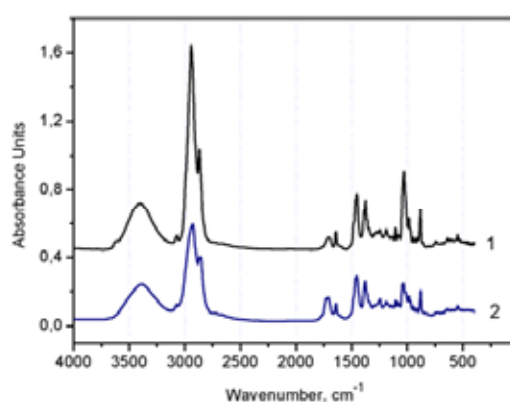


Рис. 4. ИК-спектр циклогексанового экстракта бересты

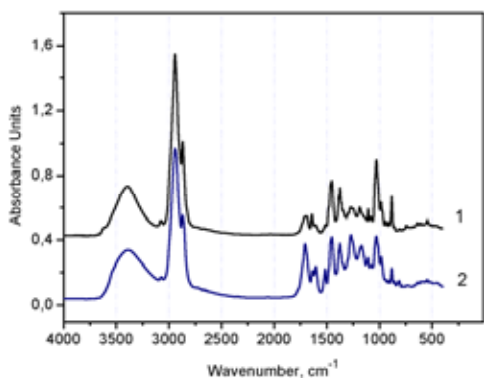


Рис. 5. ИК-спектр ацетонитрильного экстракта бересты

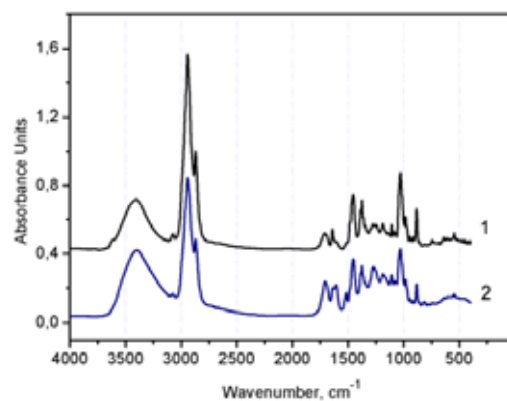


Рис. 6. ИК-спектр экстракта бересты диэтиловым эфиром

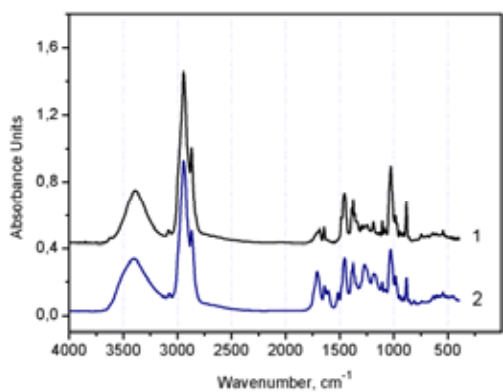


Рис. 7. ИК-спектр этилацетатного экстракта бересты: 1 – фракция 1, 2 – фракция 2

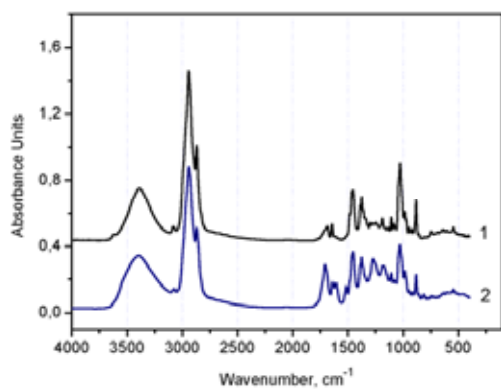


Рис. 8. ИК-спектр ацетонового экстракта бересты: 1 – фракция 1, 2 – фракция 2

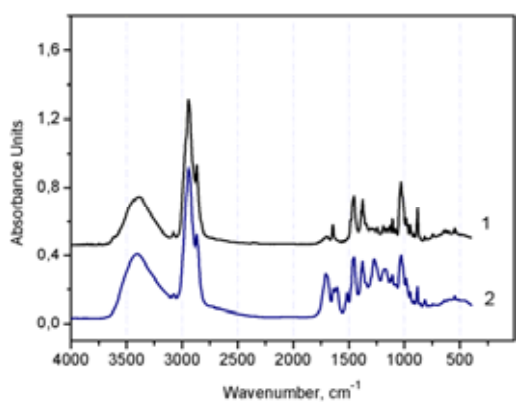


Рис. 9. ИК-спектр изопропанольного экстракта бересты: 1 – фракция 1, 2 – фракция 2

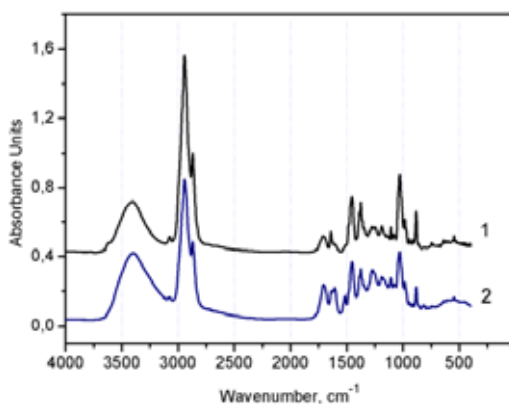


Рис. 10. ИК-спектр этанольного экстракта бересты: 1 – фракция 1, 2 – фракция 2

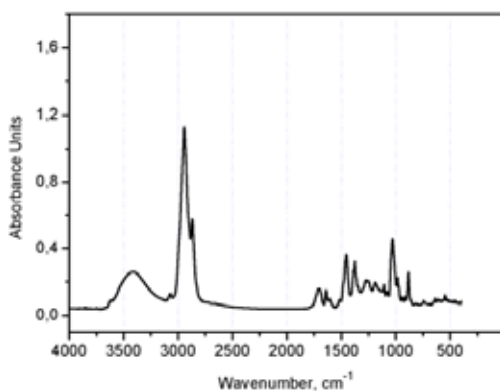


Рис. 11. ИК-спектр диоксанового экстракта бересты: 1 – фракция 1, 2 – фракция 2

существенно отличаются от ИК-спектров вторых фракций, выделенных полярными растворителями – этилацетатом, ацетоном, этанолом и изопропанолом. В ИК-спектрах вторых фракций (рис. 6-10) в области 1720-1730 и 1200-1250 см<sup>-1</sup> присутствуют широкие полосы поглощения характерные для фенольных дубильных веществ. Наличие фенольных веществ подтверждено известной реакцией – при нагревании их спиртовых растворов в присутствии соляной кислоты реакционная масса приобретает вишнёвую окраску, что свидетельствует об образовании антоцианидинов [12].

Изучение экстракции бересты растворителями различной полярности показало, что использование полярных растворителей позволяет получать экстракты с выходом 24-29 %, содержащих 90-95 % бетулина.

Установлено, что при экстракции бересты перечисленной выше группой растворителей наряду с бетулином извлекается и бетулиновая кислота, причем максимальное её содержание до 9 % наблюдается в экстрактах, полученных полярными растворителями.

### Список литературы

1. Pasich J. Emulgatory z grupy trojterpenoidow. Cz. 1. Ekstrakcja betuliny z kory rozowy Betula alba L. za pomoca trojchloretylenu // *Farmac. polska*. 1964. Bd. 20, № 23-24. S. 911-914.
2. Jaaskelainen P. Betulinol and its utilization // *Paperi ja Puu Pap. och Tra*. 1981. № 10. P. 599-603.
3. Eckerman Ch., Ekman R. Comparison of solvents for extraction and crystallization of betulinol from birch bark waste // *Paperi ja Puu Pap. och Tra*. 1985. № 3. P. 100-106.
4. Патент 2206572 РФ. Способ выделения бетулинола / М.С. Борц, Е.Г. Николаева, И.С. Лавевский // *Опубл.* 20.06.2003.
5. Патент 2192879 РФ. Способ получения бетулина / Ю.И. Стернин // *Опубл.* 20.11.2002.
6. Патент 2138508 РФ. Способ выделения бетулинола / А.Н. Кислицын, И.И. Сладников, А.Н. Трофимов // *Опубл.* 27.09.1999.
7. Патент 2184120 РФ. Способ получения бетулина / В.И. Роцин, Н.Ю. Шабанова, Д.Н. Ведерников // *Опубл.* 27.06.2002.
8. Патент 2172178 РФ. Способ получения бетулина / Г.В. Сироткин, Ю.И. Стернин // *Опубл.* 20.08.2001.
9. Абышев А.З., Журкович И.К., Агаев Э.М., Абдулла-заде А.А., Гусейнов А.Б. Методы стандартизации качества субстанций бетулинола и его лекарственных форм // *Химико-фармацевтический журнал*. 2006. Т. 40, № 1. С. 49-53.
10. Ле Банг Шон, Каплун А.П., Шпилевский А.А., Андия-Правдивый Ю.Э., Алексева С.Г., Григорьев В.Б., Швец В.И. Синтез бетулиновой кислоты из бетулина и исследование её солюбилизации с помощью липосом // *Биоорганическая химия*. 1998. Т 24, № 10. С. 787-793.
11. Darrick S.H.L. Kim, Zhidong Chem, Van Tuyen Nguen, John M. Pezzuto, Shengxiang Qiu, Zhi-Zhen Lu. A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin // *Synthetic communication*. 1997. Vol. 27, N 9. P. 1607-1612.
12. Era V., Jaaskelainen P., Ukkonen K. Fatty acid esters from Betulinol // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1981. V. 58. P. 20-23.



13. Левданский В.А., Кузнецов Б.Н. Получение антоцианидиновых красителей из луба коры берёзы *Betula Pendula* Roth. // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 25-28.

## **Influence of the Nature of Organic Solvent on Betulin Isolation from an External Layer of a Birch Bark**

**Vladimir A. Levdansky<sup>a,b</sup>,  
Irina V. Korolkova<sup>a</sup>, Alexandr V. Levdansky<sup>a</sup>,  
Natalia M. Ivanchenko<sup>a</sup> and Boris N. Kuznetsov<sup>a,b\*</sup>**

<sup>a</sup> *Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS  
50-24 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

<sup>b</sup> *Siberian Federal University,  
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

---

*Extraction of betulin by hexane, petroleum-ether, benzene BR-1, cyclohexane, acetonitrile, diethyl ether, ethyl acetate, acetone, isopropanol, ethanol, and 1,4-dioxane in a Soxhlet's (extraction) apparatus has been studied. Comparative studying of the obtained extracts has been executed with use of a method of IR-spectroscopy. The content of betulin and betulin acid in extracts, which have been isolated after their concentration to 1/4 initial volumes and in extracts which have been isolated after full removal of solvent, has been defined with using a method of a highly effective liquid chromatography (HPLC). It was established, that use of polar solvents allows to receive extracts with an yield to 28,8 % and the content of betulin from 90 to 95 %.*

*Keywords: hexane, petroleum-ether, benzene BR-1, cyclohexane, acetonitrile, diethyl ether, ethyl acetate, acetone, isopropanol, ethanol, 1,4-dioxane, extract, betulin, betulinic acid.*

---