

УДК 547.918:543.422

РАЗРАБОТКА ОДНОСТАДИЙНОГО СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ АЛЛОБЕТУЛИНА ИЗ БЕРЕСТЫ КОРЫ БЕРЕЗЫ И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ

© *Е.С. Скуридина¹, Н.Ю. Васильева^{1,2}, С.А. Кузнецова^{1*}, Н.М. Титова², Б.Н. Кузнецов^{2,3}*

¹ *Институт химии и химической технологии СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок, 50/24, Красноярск, 660036 (Россия),
e-mail: kuznetssvetl@yandex.ru*

² *Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, 79/4, Красноярск, 660041 (Россия)*

³ *ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок, 50/24, Красноярск, 660036 (Россия)*

Кора березы содержит экстрактивные вещества лупанового ряда, обладающие фармакологической активностью и представляющие интерес для получения новых лекарственных препаратов. Преобладающим компонентом экстрактов внешней коры березы является пентациклический тритерпеновый спирт – бетулин. Аллобетулин (19,28-эпокси-олеанан-3-ол) является изомером бетулина и относится к пентациклическим тритерпеноидам олеананового ряда. Аллобетулин и его производные нетоксичны и обладают противовирусной, противомикробной и противоопухолевой активностями. Разработан новый одностадийный способ получения аллобетулина непосредственно из бересты коры березы путем совмещения стадий экстракции бетулина этанолом и его изомеризации в аллобетулин в присутствии катализатора ортофосфорной кислоты. Установлено влияние продолжительности процесса обработки бересты этанолом и содержания H_3PO_4 на выход аллобетулина. Наибольший выход неочищенного аллобетулина (35% от массы а.с.б.) достигается при продолжительности процесса 8 ч в присутствии 5% H_3PO_4 , а также при продолжительности 15 ч в присутствии 3% H_3PO_4 . Выход перекристаллизованного аллобетулина составляет около 22% от массы а.с.б.

Состав образца аллобетулина после перекристаллизации из изопропанола подтвержден методом элементного анализа, а его строение – методами ИК- и ^1H ЯМР-спектроскопии.

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* установлены антиоксидантные свойства аллобетулина.

Ключевые слова: аллобетулин, береста, экстракция, изомеризация, эксперименты *in vivo*, *in vitro*, антиоксидантная активность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания Института химии и химической технологии СО РАН ФИЦ КНЦ СО РАН (проект FWES-2021-0017). В работе использовано оборудование Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

Введение

Кора березы содержит экстрактивные вещества лупанового ряда, обладающие фармакологической активностью и представляющие интерес для получения новых лекарственных препаратов. Преобладающим компонентом экстрактов внешней коры березы является пентациклический тритерпеновый спирт – бетулин(луп-20(29)-ен-3 β ,28-диол) [1–3]. Бетулин и его производные проявляют гастро- и гепатопротекторные, капилляроукрепляющие, антиоксидантные, противовирусные и противоопухолевые свойства [4–9].

Скуридина Евгения Сергеевна – ведущий инженер,
e-mail: zenav@mail.ru

Васильева Наталья Юрьевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, доцент кафедры,
e-mail: vasilyeva.nata@mail.ru

Окончание на С. 244.

Аллобетулин (19,28-эпокси-олеанан-3-ол) является изомером бетулина и относится к пентациклическим тритерпеноидам олеананового ряда.

Аллобетулин и его производные нетоксичны и обладают противовирусной, противомикробной и

* Автор, с которым следует вести переписку.

противоопухолевой активностями [10–12]. В экспериментах *in vitro* и с применением метода вольтамперометрии было показано, что аллобетулин проявляет антиоксидантные свойства [13, 14].

Изомеризация бетулина в аллобетулин обычно проводится в кислой среде в органических растворителях. Известен способ изомеризации бетулина в аллобетулин в присутствии ортофосфорной кислоты при нагревании в растворе кислородосодержащих органических растворителей [15]. В работе [16] описан способ изомеризации бетулина в аллобетулин в присутствии сильнокислотного катионита Амберлист 15 в среде хлороформа при комнатной температуре. Авторами работы [17] предложен способ получения аллобетулина при комнатной температуре, основанный на изомеризации бетулина в дихлорметане в присутствии комплекса тетрафторборной кислоты с диэтиловым эфиром. Недостатками всех вышеперечисленных способов является использование дорогих токсичных растворителей и необходимость применения отдельной стадии выделения бетулина из бересты.

В ИХХТ СО РАН (Красноярск) разработан одностадийный способ получения аллобетулина непосредственно из бересты коры березы путем ее пропитки ортофосфорной или серной кислотами с последующим кипячением в толуоле или *n*-ксилоле. Выход аллобетулина после перекристаллизации из этанола составляет до 23% от массы абсолютно сухой бересты (а.с.б.). Установлено, что максимальный выход аллобетулина достигается при использовании 40–50% кислоты и продолжительности процесса 3 и 4 ч при использовании в качестве растворителей *n*-ксилола и толуола соответственно [18].

Ранее нами был предложен одностадийный способ получения аллобетулина непосредственно из бересты коры березы, совмещающий стадии экстракции бетулина из бересты гексаном и его изомеризации в аллобетулин в присутствии ортофосфорной кислоты. Выход аллобетулина после перекристаллизации из смеси этанола и этилацетата составил около 21% от массы абсолютно сухой бересты (а.с.б.) [19].

Основным недостатком рассмотренных способов получения аллобетулина является использование токсичных растворителей (*n*-ксилола, толуола и гексана). Актуальной задачей при получении биологически активных веществ из растительного сырья, пригодных для использования в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности является использование экологически чистых растворителей. Для снижения химических рисков, связанных с производством и применением токсичных растворителей, в «зеленой» химии используются менее токсичные вещества, такие как этанол, этилацетат, пероксид водорода, сверхкритический CO₂ и др. [20, 21]. В данной работе впервые предложено использовать малотоксичный этанол в качестве растворителя при получении биологически активного аллобетулина.

Известно, что биодоступность веществ может существенно различаться в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [22]. Поэтому является целесообразным сопоставить антиоксидантную активность аллобетулина не только на клетках, но и на живых организмах.

Цель данного исследования – разработка нового одностадийного способа получения аллобетулина непосредственно из бересты коры березы, исключающего предварительное выделение бетулина, и основанного на использовании «зеленого» растворителя этанола, а также катализатора ортофосфорной кислоты. Осуществлен подбор оптимальных условий получения аллобетулина из бересты березы и изучена его антиоксидантная активность в экспериментах *in vivo* и *in vitro*.

Экспериментальная часть

В качестве исходного сырья использовали внешнюю часть коры (бересту) *Betula Pendula* Roth., заготовленную в окрестностях Красноярска в июне 2021 г. Бересту измельчали до частиц размером 1–3 мм и высушивали при 105 °С до влажности менее 1%. Химический состав бересты (% от массы а.с.б.): экстрактивные вещества 40.1; суберин 38.7; лигнин 13.4; трудногидролизуемые полисахариды 5.8; целлюлоза 3.4; зола 2.1 [1].

Кузнецова Светлана Алексеевна – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник,
e-mail: kuznetssvetl@yandex.ru

Титова Надежда Митрофановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры,
e-mail: nmtitova@sfu-kras.ru

Кузнецов Борис Николаевич – доктор химических наук, профессор, профессор кафедры, руководитель научного направления, e-mail: bnk@icct.ru

Аллобетулин получали непосредственно из бересты коры березы путем ее кипячения в среде этанола в присутствии ортофосфорной кислоты.

Схема получения аллобетулина из бересты коры березы представлена на рисунке 1. В процессе обработки этанолом из бересты экстрагируется бетулин, который под действием катализатора (ортофосфорной кислоты), изомеризуется в аллобетулин.

Измельченную воздушно-сухую бересту коры березы помещали в аппарат Сокслета, добавляли 96%-ный этанол и ортофосфорную кислоту. Содержание H_3PO_4 в экстракционном растворе варьировалось от 1 до 5%. Продолжительность процесса экстракции составляла от 2 до 15 ч. По окончании процесса проводили горячее фильтрование реакционной массы и отгоняли растворитель из фильтрата до 1/3 объема. Концентрат выливали в трехкратный объем дистиллированной воды, полученный осадок аллобетулина-сырца отфильтровывали, промывали на фильтре до нейтральной реакции промывных вод, высушивали при комнатной температуре до постоянной массы. Полученный аллобетулин-сырец перекристаллизовывали из изопропанола. Выход перекристаллизованного аллобетулина составляет около 22% от массы а.с.б.

ИК-спектроскопическое исследование перекристаллизованного аллобетулина выполнено на ИК-Фурье спектрометре (Vector 22) в области длин волн $400\text{--}4000\text{ см}^{-1}$. Образец аллобетулина (2 мг) запрессовывали в матрицу бромистого калия. Обработка спектральной информации проводилась на программе OPUS/J (версия 2.2).

^1H ЯМР-спектр перекристаллизованного аллобетулина снят с использованием спектрометра Bruker Avance III 600 МГц в дейтерохлороформе с привязкой к дейтериевому резонансу растворителя.

Элементный анализ перекристаллизованного аллобетулина выполняли на элементном анализаторе Flash EATM-1112 (Thermo Quest Italia), одновременно определяющем количество (в%) С, О, N, S и Н.

Температуру плавления перекристаллизованного аллобетулина определяли на приборе Electrothermal A9100.

Антиоксидантную активность аллобетулина в экспериментах *in vivo* изучали в условиях плавательного стресса крыс, оценивая содержание в печени и крови животных малонового диальдегида (МДА) и активности ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы [23, 24].

Экспериментальные животные массой 200–310 г были разделены на 3 группы: здоровые (контрольная группа), стрессовая и опытная группы. Здоровые животные в течение всего эксперимента содержались в виварии при комнатной температуре без ограничений в воде и пище. Стрессовую и опытную группы крыс подвергали тренировке плаванием с нагрузкой в бассейне с водой в течение двух недель ежедневно. Опытной группе крыс за 30 минут до начала тренировки перорально вводили суспензию, содержащую аллобетулин (100 мг аллобетулина на 1 кг веса тела животного). Суспензию готовили следующим образом: в 50 мл масла для инъекций добавляли 1 г аллобетулина, тщательно перемешивали и оставляли на 3 суток. Кровь и печень для исследований забирали у животных после декапитации, в тот же день исследовали собранные образцы: определяли количество малонового диальдегида и активность ферментов супероксиддисмутазы и каталазы.

В экспериментах *in vitro* активацию перекисного окисления липидов вызывали введением в реакционные смеси, содержащие эритроциты и плазму крови крыс (супернатанат), индуктора окислительного стресса: аскорбата и сульфата железа (II).

Для приготовления стрессовой пробы брали 1 мл супернатаната, добавляли 100 мкл 10 мМ раствора FeSO_4 , 100 мкл 1 мМ раствора аскорбата и 100 мкл физиологического раствора. В опытные пробы вместо физиологического раствора добавляли спиртовой (этанольный) раствор с концентрацией аллобетулина 100 мкг/г ткани. Для приготовления контрольной пробы к 1 мл супернатаната добавляли 100 мкл спирта и 200 мкл физиологического раствора.

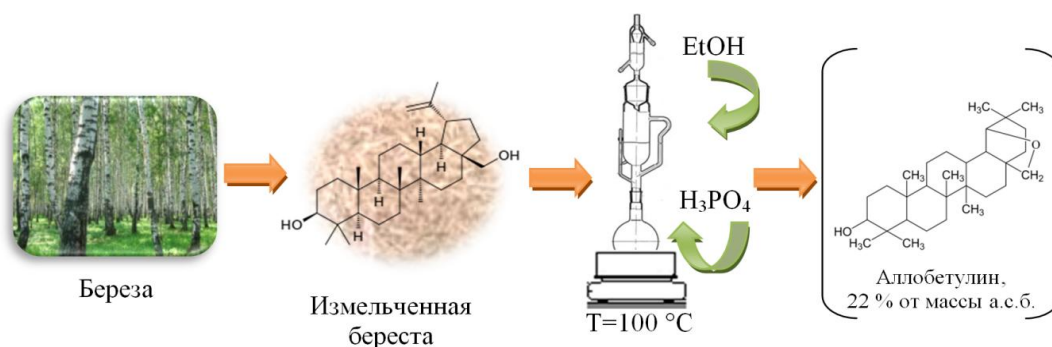


Рис. 1. Схема получения аллобетулина из бересты коры березы

Все пробы инкубировали в термостате при 37 °С в течение одного часа. Отбор проб проводился с шагом в 30 мин. Об уровне антиоксидантной активности судили по содержанию малонового диальдегида и активности ферментов СОД и каталазы [24, 25].

При проведении исследования выполняли требования нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных, в том числе по гуманному отношению к ним [26].

Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики. Для оценки статистической достоверности различий сравниваемых средних величин использовали критерий Стьюдента [27].

Обсуждение результатов

Получение аллобетулина из бересты коры березы и его идентификация

Реакция изомеризации бетулина, содержащегося в бересте коры березы, происходит в присутствии кислотного катализатора с расширением цикла по схеме, представленной на рисунке 2.

После перекристаллизации аллобетулина-сырца из изопропанола получены белые игольчатые кристаллы чистого аллобетулина с температурой плавления 261 °С, что соответствует литературным данным [28].

На основании данных элементного анализа перекристаллизованного аллобетулина найдено, %: (С) 82.55; (Н) 10.79; (О) 6.66. Вычислено (С₃₀Н₅₀О₂).%: (С) 81.45; (Н) 11.31; (О) 7.24.

В таблице 1 представлены результаты исследования образца перекристаллизованного аллобетулина методами ИКС и ¹Н ЯМР.

В ¹Н-ЯМР-спектре перекристаллизованного аллобетулина отсутствуют сигналы, соответствующие сигналам двух протонов =СН₂ группы в области 4.5 δ м.д., характерные для бетулина.

На рисунке 3 представлены ИК-спектры образцов аллобетулина-сырца и аллобетулина после перекристаллизации.

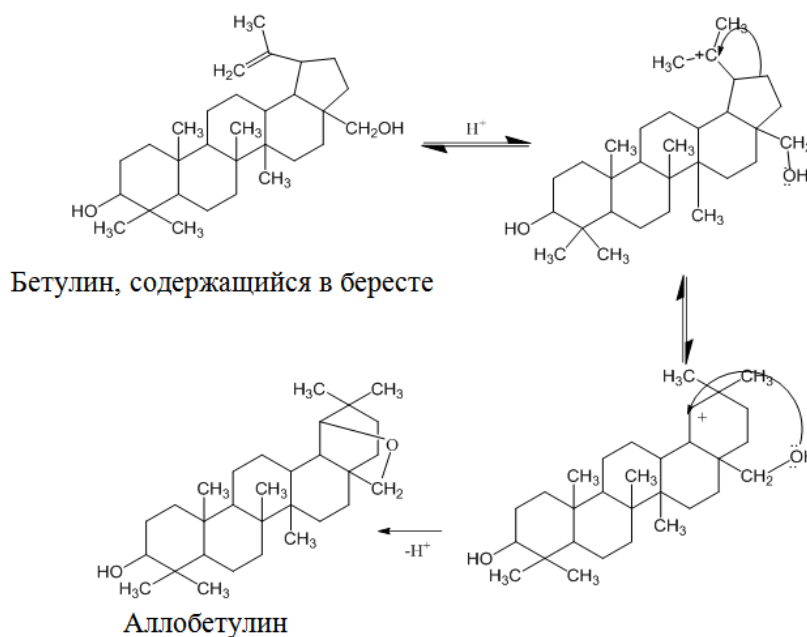


Рис. 2. Схема изомеризации бетулина, содержащегося в бересте, в аллобетулин в присутствии катализатора Н₃Р₀₄

Таблица 1. Отнесение полос в ИК и ¹Н-ЯМР-спектрах перекристаллизованного аллобетулина

Вещество	ИК-спектр (ν, см ⁻¹)	Спектр ¹ Н ЯМР
Перекристаллизованный аллобетулин	3429 (О-Н), 2937, 2868 (С-Н), 1451, 1386 (С-СН ₃), 1076 (С-О-С)	3.85 (d, J=8 Hz, 1H, 28-Н), 3.58 (s, 1H, 19-Н), 3.51 (d, J=8 Hz, 1H, 28-Н), 3.29 (m, 1H, 3-Н), 1.00–1.77 (комплекс СН ₂ , СН), 0.99, 0.97, 0.90, 0.85, 0.82 (все синглеты, 21Н, СН ₃)

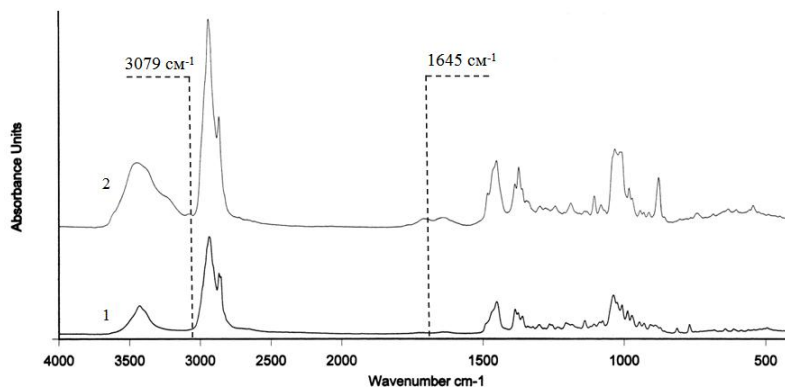


Рис. 3. ИК-спектры перекристаллизованного аллобетулина (1) и аллобетулина-сырца (2)

В ИК-спектре неочищенного аллобетулина присутствуют слабо выраженные полосы поглощения: С-Н при 3079 см^{-1} и С=C группы при 1645 см^{-1} , что указывает на присутствие примесей бетулина или лупеола. После перекристаллизации аллобетулина из изопропанола данные полосы исчезают.

Таким образом, состав и строение перекристаллизованного аллобетулина подтверждены методами элементного анализа, ИК- и ^1H ЯМР-спектроскопии.

Было изучено влияние продолжительности процесса обработки бересты этанолом (от 2 до 15 ч) и содержания катализатора H_3PO_4 (1, 2, 3, 5%) на выход аллобетулина-сырца (рис. 4).

Наиболее высокий выход неочищенного аллобетулина из бересты берёзы (35% от массы а.с.б.) достигается при следующих условиях: содержание H_3PO_4 5% и продолжительность процесса 8 ч или 3% H_3PO_4 и продолжительность 15 ч.

Выход аллобетулина после перекристаллизации из изопропанола составил около 22% от массы а.с.б.

Исследование антиоксидантной активности аллобетулина в экспериментах in vivo в условиях плавающего стресса

Результаты экспериментов *in vivo* по определению содержания МДА в печени и эритроцитах крови экспериментальных крыс представлены в таблице 2.

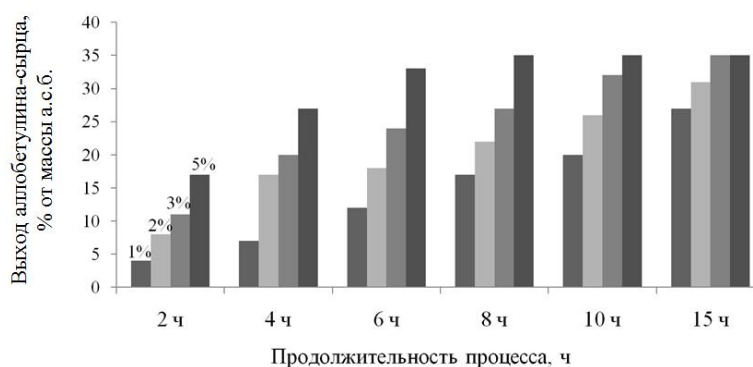


Рис. 4. Влияние продолжительности процесса обработки бересты этанолом и содержания H_3PO_4 в смеси на выход аллобетулина-сырца

Таблица 2. Содержание МДА в печени и эритроцитах экспериментальных крыс

Условия эксперимента	Количество МДА	
	в печени, нмоль/г ткани	в эритроцитах, нмоль/мл
Контрольная группа (n=5)	426±11	6.6±0.2
Стрессовая группа (n=5)	522±31 (p<0.02)*	12.8±0.4 (p<0.001)*
Опытная группа (n=5)	490±5 (p<0.01)**	5.5±0.2 (p<0.001)**

Примечание: n – число параллельных определений, p – доверительная вероятность.

* – достоверность различий стрессовой группы по сравнению с контрольными животными.

** – достоверность различий опытной группы по сравнению со стрессовой группой.

В условиях плавательного стресса у опытной группы крыс, получавшей аллобетулин, наблюдается снижение уровня малонового диальдегида в печени в 1.1 раза и в эритроцитах в 2.3 раза по сравнению со стрессовой группой животных, что свидетельствует о проявлении аллобетулином антиоксидантной активности.

Результаты исследования активности супероксиддисмутазы в печени и эритроцитах животных в экспериментах *in vivo* представлены в таблице 3.

У стрессовой группы крыс активность супероксиддисмутазы в эритроцитах крови и в печени ниже, чем у контрольных животных, в 1.5 и в 2.2 раза соответственно. Снижение активности СОД у стрессовых животных, как в печени, так и в эритроцитах свидетельствует о возрастании концентрации супероксидного анион-радикала, который при взаимодействии с пероксидом водорода образует реакционноспособный гидроксильный радикал. Данный радикал инициирует процессы перекисного окисления липидов. Промежуточные продукты перекисного окисления липидов связываются с ферментом и не дают ему утилизировать АТФ, либо чрезмерное накопление этих продуктов ингибирует процесс синтеза фермента.

Показатели активности СОД в эритроцитах крови и в печени у опытной группы крыс, получавших аллобетулин в 2.5 и в 1.2 раза выше, чем у стрессовой группы животных, что подтверждает антиоксидантные свойства аллобетулина в экспериментах *in vivo*.

В таблице 4 представлены данные по активности каталазы в печени и эритроцитах животных в экспериментах *in vivo*.

Активность каталазы в печени опытной группы крыс, получающей аллобетулин, повысилась в 3 раза, а в эритроцитах – в 1.2 раза по сравнению со стрессовой группой животных, подтверждая антиоксидантные свойства аллобетулина в экспериментах *in vivo*.

Исследование антиоксидантной активности аллобетулина в экспериментах in vitro

Об антиоксидантном действии аллобетулина в экспериментах *in vitro* судили по его способности влиять на накопление МДА, а также на активность СОД и каталазы в тканях печени крыс при воздействии индуктора окислительного стресса (аскорбат + FeSO₄).

Содержание малонового диальдегида в эксперименте *in vitro* в клетках печени определяли в начале эксперимента, через 30 и 60 мин (табл. 5).

Таблица 3. Активность супероксиддисмутазы в печени и эритроцитах животных в экспериментах *in vivo*

Условия эксперимента	Активность СОД	
	печень, у.е./г ткани	эритроциты, у.е./мл
Контрольная группа (n=5)	1.39±0.03	1.19±0.06
Стрессовая группа (n=5)	0.93±0.05 (p<0.001)*	0.54±0.03 (p<0.001)*
Опытная группа (n=5)	1.14±0.04 (p<0.001)**	1.35±0.03 (p<0.001)**

Примечание: n – число параллельных определений, p – доверительная вероятность; * – достоверность различий стрессовой группы по сравнению с контрольными животными; ** – достоверность различий опытной группы по сравнению со стрессовой группой.

Таблица 4. Активность каталазы в печени и эритроцитах животных в экспериментах *in vivo*

Условия эксперимента	Активность каталазы	
	печень, моль/(мин·г ткани)	эритроциты, моль/(мин·мл)
Контрольная группа (n=5)	26.72±0.22	2.40±0.06
Стрессовая группа (n=5)	22.47±0.59 (p<0.001)*	2.82±0.02 (p<0.001)*
Опытная группа (n=5)	68.06±0.19 (p<0.001)**	3.32±0.01 (p<0.001)**

Примечание: n – число параллельных определений, p – доверительная вероятность; * – достоверность различий стрессовой группы по сравнению с контрольными животными; ** – достоверность различий опытной группы по сравнению со стрессовой группой.

Таблица 5. Изменение содержания МДА в печени при инкубации с индукторами окислительного стресса и аллобетулина

Условия эксперимента	Содержание МДА, мкмоль/мин·г ткани		
	0, мин	30, мин	60, мин
Контрольная проба (n=7)	346±8	453±7	390±8
Стрессовая проба (n=6)	429±7 (p<0.001)*	1030±11 (p<0.001)*	398±6 (p<0.01)*
Опытная проба (n=6)	326±9 (p<0.001)**	504±8 (p<0.001)**	363±8 (p<0.001)**

Примечание: n – число параллельных определений, p – доверительная вероятность; * – достоверность различий стресса по сравнению с контролем; ** – достоверность различий опыта по сравнению с параметром стресса.

Из приведенных в таблице 5 данных следует, что в условиях окислительного стресса в экспериментах *in vitro* через 30 мин после начала эксперимента происходит увеличение МДА в 2.3 раза в стрессовой пробе по сравнению с контролем. В опытной пробе с аллобетулином через 30 мин начала эксперимента произошло снижение МДА в 2 раза, по сравнению со стрессовой пробой, а через 60 мин содержание МДА в опытной пробе стало ниже, чем в контрольной пробе, что указывает на хорошие антиоксидантные свойства аллобетулина.

Поскольку максимальное содержание МДА при окислительном стрессе наблюдалось через 30 мин после инкубации гомогената печени, то этот временной интервал был выбран нами для изучения влияния аллобетулина на активность антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и каталазы в экспериментах *in vitro* (табл. 6).

При добавлении индуктора окислительного стресса наблюдается снижение активности супероксиддисмутазы и каталазы относительно контроля, что указывает на протекание процесса перекисного окисления липидов. Добавление спиртового раствора аллобетулина способствует увеличению активности каталазы в 1.1 раза и активности супероксиддисмутазы в 1.5 раза по сравнению со стрессовыми пробами, что подтверждает антиоксидантные свойства аллобетулина.

Таким образом, антиоксидантные свойства аллобетулина подтверждены результатами экспериментов *in vitro*, а также *in vivo*. Введение аллобетулина способствует достоверному снижению уровня малонового диальдегида, а также значимому повышению активности супероксиддисмутазы и каталазы.

Таблица 6. Изменение активности супероксиддисмутазы и каталазы в печени на 30-минутном промежутке инкубации проб в экспериментах *in vitro*

Условия эксперимента	Активность СОД, у.е./мин·г ткани	Содержание каталазы в печени, моль/мин·г ткани
Контрольная проба (n=4)	1.02±0.01	46.39±0.56
Стрессовая проба (n=5)	0.86±0.07 (p<0.02)*	36.45±0.32 (p<0.01)*
Опытная проба (n=6)	1.26±0.04 (p<0.001)**	41.50±1.24 (p<0.001)**

Примечание: n – число параллельных определений, p – доверительная вероятность; * – достоверность различий стресса по сравнению с контролем; ** – достоверность различий опыта по сравнению с параметром стресса.

Выводы

Разработан новый одностадийный способ получения аллобетулина непосредственно из бересты коры березы, исключая предварительное выделение бетулина, основанный на использовании «зеленого» растворителя этанола и катализатора H_3PO_4 . Выход перекристаллизованного аллобетулина составляет около 22% от массы а.с.б.

Наиболее высокий выход неочищенного аллобетулина (35% от массы а.с.б.) достигается при продолжительности процесса 8 ч в присутствии 5% H_3PO_4 , а также при продолжительности 15 ч в присутствии 3% H_3PO_4 .

Состав полученного после перекристаллизации из изопропанола образца аллобетулина подтвержден методом элементного анализа, а его строение – методами ИК- и ^1H ЯМР-спектроскопии.

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* установлены антиоксидантные свойства аллобетулина. Введение аллобетулина способствует достоверному снижению уровня малонового диальдегида, а также значимому повышению активности супероксиддисмутазы и каталазы.

Список литературы

1. Кузнецов Б.Н., Левданский В.А., Кузнецова С.А. Химические продукты из древесной коры. Красноярск, 2012. 260 с.
2. Demets O.V., Takibayeva A.T., Kassenov R.Z., Aliyeva M.R. Methods of Betulin Extraction from Birch Bark // *Molecules*. 2022. Vol. 27. N11. Article 3621. DOI: 10.3390/molecules27113621.
3. Koptelova E.N., Kutakova N.A., Tretjakov S.I., Faleva A.V., Razumov E., Barčík Š. Extraction of betulin from the birch bark balance at pulp and paper production // *Wood Res*. 2020. Vol. 65. Pp. 833–842. DOI: 10.37763/wr.1336-4561/65.5.833842.
4. Amiri Sh., Dastghaib S., Ahmadi M., Mehrbod P. et al. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects // *Biotechnology Advances*. 2020. Vol. 38. Article 107409. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.06.008.
5. Воробьева О.А., Малыгина Д.С., Грубова Е.В., Мельникова Н.Б. Производные бетулина. Биологическая активность и повышение растворимости // *Химия растительного сырья*. 2019. №4. С. 407–430. DOI: 10.14258/jcprm.2019045419.

6. Zhao J., Li R., Pawlak A., Henklewska M., Sysak A., Wen L., Obmińska-Mrukowicz B. Antitumor activity of betulinic acid and betulin in canine cancer cell lines // *In vivo*. 2018. Vol. 32. N5. Pp. 1081–1088. DOI: 10.21873/invivo.11349.
7. Кузнецова С.А., Скворцова Г.П., Мальяр Ю.Н., Скурыдина Е.С., Веселова О.Ф. Выделение бетулина из бересты березы и изучение его физико-химических и фармакологических свойств // *Химия растительного сырья*. 2013. №2. С. 93–100. DOI: 10.14258/jcprm.201302093.
8. Šiman P., Filipová A., Tichá A., Niang M., Bezrouk A., Havelek R. Effective method of purification of betulin from birch bark: the importance of its purity for scientific and medicinal use // *PLoS one*. 2016. Vol. 11. N5. Article e0154933. DOI: 10.1371/journal.pone.0154933.
9. Кузнецов Б.Н., Левданский В.А., Кузнецова С.А., Когай Т.И. Синтез биологически активных тритерпеновых соединений на основе бетулина // *Журнал Сибирского федерального университета. Химия*. 2011. Т. 4. №4. С. 408–423.
10. Dehaen W., Mashentseva A.A., Seitembetov T.S. Allobetulin and its derivatives: synthesis and biological activity // *Molecules*. 2011. Vol. 16. N3. Pp. 2443–2466. DOI: 10.3390/molecules16032443.
11. Strobkyina I.Y., Garifullin B.F., Strobkyina A.S., Voloshina A.D., Sharipova R.R., Kataev V.E. Allobetulin N-acetylglucosaminide. Synthesis and antimicrobial activity // *Russian Journal of General Chemistry*. 2017. N87. Pp. 890–893. DOI: 10.1007/s10600-017-2210-1.
12. Wang Y., Huang X., Zhang X., Wang J., L. K., Liu G., Lu K., Zhang X., Xie Ch., Zheng T., Cheng Yu.-Y., Wang Q. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Allobetulin/Allobetulin–Nucleoside Conjugates as Antitumor Agents // *Molecules*. 2022. Vol. 27. N15. Article 4738. DOI: 10.3390/molecules27154738.
13. Воронова О.А., Плотников Е.В., Калиева С.С., Нурпейис Е.Е., Мамаева Е.А., Ташенов А.К., Бакибаев А.А. Исследование антиоксидантной активности представителей тритерпеноидов лупанового и олеанового ряда методом вольтамперометрии // *Вестник Карагандинского университета. Серия: Химия*. 2017. №3. С. 31–37.
14. Воробьева О.А., Мальгина Д.С., Соловьева А.Г., Беляева К.Л., Грубова Е.В., Мельникова Н.Б. Антиоксидантные и прооксидантные свойства производных бетулина // *Биорадикалы и антиоксиданты*. 2018. Т. 5. №4. С. 9–20.
15. Патент №2174126 (РФ). Способ получения аллобетулина / А.Н. Кислицын, А.Н. Трофимов. – 2001.
16. Филиппова Е.А., Шахмаев Р.Н., Зорин В.В. Практичный метод получения аллобетулина // *Журнал общей химии*. 2013. Т. 83. №8. С. 1404–1405.
17. Grymel M., Adamek J. Allobetulin // *Molbank*. 2022. Vol. 3. Article M1446. DOI: 10.3390/M1446.
18. Левданский В.А., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н. Новые способы одностадийного синтеза аллобетулина, бензоата и фталата аллобетулина // *Химия растительного сырья*. 2010. №1. С. 75–80.
19. Патент №2334759 (РФ). Способ получения аллобетулина / С.А. Кузнецова, Б.Н. Кузнецов, Е.С. Редькина, Г.П. Скворцова. – 2008.
20. Меньшутина Н.В., Казеев И.В., Артемьев А.И., Бочарова О.А., Худеев И.И. Применение сверхкритической экстракции для выделения химических соединений // *Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология*. 2021. Т. 64. №6. С. 4–19. DOI: 10.6060/ivkkt.20216406.6405.
21. Kerton F.M., Marriott R. *Alternative solvents for green chemistry*. Cambridge: Royal Society of chemistry, 2013. 343 p.
22. Аюпова Г.В., Давлетшина Р.Я., Иксанова Г.Р., Лиходед В.А. *Биофармация*. Уфа, 2011. 113 с.
23. 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.
24. Аругюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации. СПб: Фолиант, 2000. 104 с.
25. Abuja P., Tatzber F. Monitoring oxidative stress and lipid peroxidation // *Clinical laboratory Int*. 2001. Vol. 7. Pp. 18–19.
26. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб: Rus-LASA «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными», рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы, 2012. 48 с.
27. Ланин Г.Ф. *Биометрия*. М., 1990. 203 с.
28. Калиева С.С., Мамаева Е.А., Нурпейис Е.Е., Бакибаев А.А., Ташенов А.К., Заманова М.К., Кургачев Д.А., Понарин Н.В. Спектральные и хроматографические характеристики бетулина и некоторых его производных // *Вестник ЕНУ им. Л.Н. Гумилева*. 2017. Т. 4. С. 235–240.

Поступила в редакцию 28 июня 2023 г.

После переработки 14 июля 2023 г.

Принята к публикации 28 августа 2023 г.

Для цитирования: Скурыдина Е.С., Васильева Н.Ю., Кузнецова С.А., Титова Н.М., Кузнецов Б.Н. Разработка одностадийного способа получения аллобетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантной активности // *Химия растительного сырья*. 2023. №3. С. 243–252. DOI: 10.14258/jcprm.20230313179.

Skurydina Ye.S.¹, Vasil'yeva N.Yu.^{1,2}, Kuznetsova S.A.^{1*}, Titova N.M.², Kuznetsov B.N.^{2,3} DEVELOPMENT OF THE ONE-STEP METHOD FOR PRODUCING ALLOBETULIN FROM BIRCH BARK AND STUDY OF ITS ANTIOXIDANT ACTIVITY

¹ Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS, Federal Research Center KSC SB RAS, Akademgorodok, 50/24, Krasnoyarsk, 660036 (Russia), e-mail: kuznetssvetl@yandex.ru

² Siberian Federal University, pr. Svobodny, 79/4, Krasnoyarsk, 660041 (Russia)

³ Federal Research Center KSC SB RAS, Akademgorodok, 50/24, Krasnoyarsk, 660036 (Russia)

Birch bark contains extractive substances of the lupan types that have pharmacological activity and are of interest for obtaining new medicines. The predominant component of external birch bark extracts is pentacyclic triterpene alcohol - betulin. Allobetulin (19,28-epoxy-oleanan-3-ol) is an isomer of betulin and belongs to the pentacyclic triterpenoids of the oleanane types. Allobetulin and its derivatives are non-toxic compounds and they have antiviral, antimicrobial and antitumor activities. A new one-step method for producing allobetulin directly from birch bark by combining the stages of betulin extraction with ethanol and its isomerization into allobetulin in the presence of phosphoric acid catalyst was developed. The effect of the duration of birch bark treatment with ethanol and H₃PO₄ content on the yield of allobetulin was established. The highest yield of crude allobetulin (35% by weight of a.s.b.) is achieved at a process duration of 8 hours in the presence of 5% H₃PO₄ and also at a duration of 15 hours in the presence of 3% H₃PO₄. The yield of recrystallized allobetulin is about 22% of the weight of absolutely dry birch bark.

The composition of the allobetulin sample after recrystallization from isopropanol was confirmed by elemental analysis and its structure by – IRS and ¹H NMR methods.

The antioxidant properties of allobetulin were established *in vivo* and *in vitro* experiments.

Keywords: allobetulin, birch bark, extraction, isomerization, *in vivo*, *in vitro* experiments, antioxidant activity.

References

1. Kuznetsov B.N., Levdanskiy V.A., Kuznetsova S.A. *Khimicheskiye produkty iz drevesnoy kory*. [Chemical products from tree bark]. Krasnoyarsk, 2012, 260 p. (in Russ.).
2. Demets O.V., Takibayeva A.T., Kassenov R.Z., Aliyeva M.R. *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 11, article 3621. DOI: 10.3390/molecules27113621.
3. Koptelova E.N., Kutakova N.A., Tretjakov S.I., Faleva A.V., Razumov E., Barcik Š. *Wood Res.*, 2020, vol. 65, pp. 833–842. DOI: 10.37763/wr.1336-4561/65.5.833842.
4. Amiri Sh., Dastghaib S., Ahmadi M., Mehrbod P. et al. *Biotechnology Advances*, 2020, vol. 38, article 107409. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.06.008.
5. Vorob'yeva O.A., Malygina D.S., Grubova Ye.V., Mel'nikova N.B. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 4, pp. 407–430. DOI: 10.14258/jcprm.2019045419. (in Russ.).
6. Zhao J., Li R., Pawlak A., Henklewska M., Sysak A., Wen L., Obmińska-Mrukowicz B. *In vivo*, 2018, vol. 32, no. 5, pp. 1081–1088. DOI: 10.21873/in vivo.11349.
7. Kuznetsova S.A., Skvortsova G.P., Malyar Yu.N., Skurydina Ye.S., Veselova O.F. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2013, no. 2, pp. 93–100. DOI: 10.14258/jcprm.201302093. (in Russ.).
8. Šiman P., Filipová A., Tichá A., Niang M., Bezrouk A., Havelek R. *PloS one*, 2016, vol. 11, no. 5, article e0154933. DOI: 10.1371/journal.pone.0154933.
9. Kuznetsov B.N., Levdanskiy V.A., Kuznetsova S.A., Kogay T.I. *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Khimiya*, 2011, vol. 4, no. 4, pp. 408–423. (in Russ.).
10. Dehaen W., Mashentseva A.A., Seitembetov T.S. *Molecules*, 2011, vol. 16, no. 3, pp. 2443–2466. DOI: 10.3390/molecules16032443.
11. Strob'ykina I.Y., Garifullin B.F., Strob'ykina A.S., Voloshina A.D., Sharipova R.R., Kataev V.E. *Russian Journal of General Chemistry*, 2017, no. 87, pp. 890–893. DOI: 10.1007/s10600-017-2210-1.
12. Wang Y., Huang X., Zhang X., Wang J., L. K., Liu G., Lu K., Zhang X., Xie Ch., Zheng T., Cheng Yu.-Y., Wang Q. *Molecules*, 2022, vol. 27, no. 15, article 4738. DOI: 10.3390/molecules27154738.
13. Voronova O.A., Plotnikov Ye.V., Kaliyeva S.S., Nurpeyis Ye.Ye., Mamayeva Ye.A., Tashenov A.K., Bakibayev A.A. *Vestnik Karagandinskogo universiteta. Seriya: Khimiya*. 2017, no. 3, pp. 31–37. (in Russ.).
14. Vorob'yeva O.A., Malygina D.S., Solov'yeva A.G., Belyayeva K.L., Grubova Ye.V., Mel'nikova N.B. *Bioradikaly i antioksidanty*, 2018, vol. 5, no. 4, pp. 9–20. (in Russ.).
15. Patent 2174126 (RU). 2001. (in Russ.).
16. Filippova Ye.A., Shakhmayev R.N., Zorin V.V. *Zhurnal obshchey khimii*, 2013, vol. 83, no. 8, pp. 1404–1405. (in Russ.).
17. Grymel M., Adamek J. *Molbank*, 2022, vol. 3, article M1446. DOI: 10.3390/M1446.
18. Levdanskiy V.A., Levdanskiy A.V., Kuznetsov B.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2010, no. 1, pp. 75–80. (in Russ.).
19. Patent 2334759 (RU). 2008. (in Russ.).
20. Men'shutina N.V., Kazeyev I.V., Artem'yev A.I., Bocharova O.A., Khudeyev I.I. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya*, 2021, vol. 64, no. 6, pp. 4–19. DOI: 10.6060/ivkkt.20216406.6405. (in Russ.).
21. Kerton F.M., Marriott R. *Alternative solvents for green chemistry*. Cambridge: Royal Society of chemistry, 2013, 343 p.

* Corresponding author.

22. Ayupova G.V., Davletshina R.Ya., Iksanova G.R., Likhoded V.A. *Biofarmatsiya*. [Biopharmacy]. Ufa, 2011, 113 p. (in Russ.).
23. Kuznetsova S.A., Vasil'yeva N.Yu., Kalacheva G.S., Titova N.M., Red'kina Ye.S., Skvortsova G.P. *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Khimiya*, 2008, vol. 1, no. 2, pp. 151–165. (in Russ.).
24. Arutyunyan A.V., Dubinina Ye.Ye., Zybina N.N. *Metody otsenki svobodnoradikal'nogo okisleniya i antioksidantnoy sistemy organizma: metodicheskiye rekomendatsii*. [Methods for assessing free radical oxidation and the body's anti-oxidant system: methodological recommendations]. St. Petersburg, 2000, 104 p. (in Russ.).
25. Abuja P., Tatzber F. *Clinical laboratory Int.*, 2001, vol. 7, pp. 18–19.
26. *Direktiva 2010/63/EU Yevropeyskogo parlamenta i soveta yevropeyskogo soyuza po okhrane zivotnykh, ispol'-zuyemykh v nauchnykh tselyakh*. [Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes]. St. Petersburg, 2012, 48 p. (in Russ.).
27. Lanin G.F. *Biometriya*. [Biometrics]. Moscow, 1990, 203 p. (in Russ.).
28. Kalieva S.S., Mamaeva E.A., Nurpeis E.E., Bakibaev A.A., Tashenov A.K., Zamanova M.K., Kurgachev D.A., Ponarin N.V. *Vestnik YeNU im. L.N. Gumileva*, 2017, vol. 4, pp. 235–240. (in Russ.).

Received June 28, 2023

Revised July 14, 2023

Accepted August 28, 2023

For citing: Skurydina Ye.S., Vasil'yeva N.Yu., Kuznetsova S.A., Titova N.M., Kuznetsov B.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2023, no. 3, pp. 243–252. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20230313179.