### УДК 630\*66.09

# Анализ продуктов экстракции и водно-щелочного гидролиза технической березовой коры под действием ЭМП СВЧ*[[1]](#footnote-1)\**

© Е.Н. Коптелова, Н.А. Кутакова[[2]](#footnote-2)\*\*, С.И. Третьяков, А.В. Фалева

Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, наб. Северной Двины, 17, Архангельск, 163001 (Россия),   
e-mail: n.kutakova@narfu.ru

Проведены исследования по выделению бетулина и суберина из отходов окорки балансов Архангельского ЦБК, измельченных на дробилке истирающего действия. Извлечение бетулина из различных фракций технической коры проведено методом экстракции 86%-м этиловым спиртом с использованием ЭМП СВЧ (СВЧ-экстракция). Суберин выделен из проэкстрагированной коры методом гидролиза водным раствором KOH также в условиях СВЧ-нагрева. Максимальный выход бетулина и суберина достигается при использовании крупных фракций коры (3–4.5 мм), представляющих собой измельченную бересту.

Полученные продукты идентифицированы методами ИКС, ЯМР и ГХ с масс-спектрометрией (ГХ/МС). Методом ВЭЖХ-анализа установлено количественное содержание компонентов в экстрактах коры. В составе экстрактивных веществ преобладает тритерпеноид бетулинол (70–72%), менее представлены бетулиновая кислота, лупеол, эритродиол. В составе мономеров суберина идентифицированы жирные, двухосновные карбоновые кислоты и гидроксикислоты, доминирует 2-гидроксидекандионовая (2-гидроксисебациновая) кислота. Определено количественное содержание феруловой кислоты – природного антиоксиданта – в продукте из разных фракций коры (от 2.65 до 11.27 г/кг). Суберин, полученный из мелких фракций коры, отличается от суберина из крупных фракций по составу. Рибофураноза и ксилоза обнаружены в продукте из фракции коры 1–2 мм, но отсутствуют в продукте из фракции 2–3 мм; ланостерол присутствует в суберине из мелкой фракции коры, циклоартенол – из крупной.

*Ключевые слова*: березовая кора, бетулин, суберин, СВЧ-экстракция, водно-щелочной гидролиз, ЭМП СВЧ, ВЭЖХ, ГХ/МС.

## Введение

|  |
| --- |
| *Коптелова Елена Николаевна* – кандидат технических наук, доцент, e-mail: e.osovskaya@narfu.ru  *Кутакова Наталья Алексеевна* – кандидат технических наук, профессор, e-mail: n.kutakova@narfu.ru  *Третьяков Сергей Иванович* – кандидат технических наук, профессор, e-mail: s.tretyakov@narfu.ru  *Фалева Анна Викторовна* – младший научный сотрудник, e-mail: a.bezumova@narfu.ru |

Основными компонентами березовой коры являются бетулин (бетулинол) и суберин, содержание которых достигает соответственно 30–40 и 40–50% [1]. Для коры березы Западной Европы вариабельность больше. Содержатся оба компонента во внешнем слое коры, бересте. Эти компоненты отличаются по химическому составу, строению, свойствам. Бетулинол – пентациклический тритерпеноид, двухатомный спирт, имеет распространенное название – бетулин, является одним из наиболее ценных биологически активных веществ [2]. Значение бетулина как фармацевтической субстанции, добавки в различные БАДы и кондитерские изделия постоянно возрастает. Извлекают бетулин в основном методом экстракции [1, 3], он составляет основу экстрактивных веществ (ЭВ).

Суберин – поперечносшитый полимер, полиэфир, который при гидролизе образует смесь кислот. Количественный анализ с помощью ГХ/МС показал, что мономеры суберина составляют около 30% экстрактов суберина. В основном он состоит из олигомерных или полимерных алифатических этерифицированных структур, причем более 40% из них являются сшитыми. Наличие высокомолекулярных алифатических структур подтверждено спектрами ЯМР [4]. В субериновый комплекс также входят фенольные соединения [5]. Концевые карбоксильные и гидроксильные группы, а также боковые гидроксильные и эпоксидные фрагменты в длинных цепях «мономеров» суберина обусловливают ценность материала как сырья для получения полимеров с оригинальной (отличительной) структурой и полезными свойствами [6].

Суберин выделяют из бересты методом ее исчерпывающего гидролиза водным или водно-спиртовым раствором щелочи (NaOH или KOH) после извлечения бетулина либо совместно с ним [7–11]. Разработаны интенсивные методы, например, активация бересты в условиях неизобарного парокрекинга [12], ультразвуковая обработка [13] или суперкритическая флюидная экстракция диоксидом углерода [14].

Перспективным методом активации сырья является использование электромагнитного поля сверхвысоких частот (ЭМП СВЧ). В работах [15–18] показана эффективность применения ЭМП СВЧ для извлечения пентациклических тритерпеноидов из различных частей растений (листья, корни, плоды). Этот метод был использован также для выделения бетулина и его спутников (лупеола, бетулиновой кислоты и эритродиола) из внешней коры березы [19]. При сравнении различных экстрагентов установлены оптимальные условия: использование этанола, температура 150 °C и продолжительность 30 мин, при этом выход бетулина сопоставим с экстракцией методом Сокслета. Отмечено, что использование лимонена в качестве растворителя позволяет извлекать наиболее чистую фракцию бетулина. В работе [18] рекомендовано для извлечения олеаноловой и урсоловой кислот из растения *Ligustrum lucidum* использовать 80% водный раствор этанола, модуль обработки 15 : 1, продолжительность 30 мин, 70 °C при мощности 500 Вт.

Ранее нами установлено [10, 20], что обработка бересты в ЭМП СВЧ позволяет сократить продолжительность процесса экстракции при выделении бетулина в 10–15 раз, и в 2 раза – продолжительность водно-щелочного гидролиза при извлечении суберина по сравнению с традиционными способами. В работе [21] предложена модель экстракции в ЭМП СВЧ, включающая три основных последовательных этапа:

1) диффузия растворителя через матрицу образца;

2) отделение растворенных веществ от активных участков матрицы образца при повышенной температуре и давлении;

3) диффузия растворенных веществ в пограничный слой на поверхности материала.

При изучении литературных данных выявлено, что состав суберина коры березы, произрастающей на Европейском Севере, недостаточно исследован. Особенный интерес представляет сравнение состава ЭВ и суберина, выделенных из отходов окорки сырья ЦБП, с составом аналогичных продуктов из свежей березовой коры.

Таким образом, цель нашего исследования − изучение продуктов экстракции и водно-щелочного гидролиза березовой коры в ЭМП СВЧ, в особенности исследование структуры и химического состава суберина.

## Экспериментальная часть

Техническую березовую кору отбирали с линии окорки балансов Архангельского ЦБК. Подсушенную до влажности 2.5% кору измельчали на дробилке истирающего действия, при этом самопроизвольно происходит разделение на луб (фракция менее 1 мм) и бересту (фракции от 1 до 4.5 мм). Чем крупнее фракция, тем больше содержание бересты. Аналогично проведена подготовка коры, заготовленной с растущих деревьев.

Извлечение экстрактивных веществ (ЭВ) проводили 86% этиловым спиртом в ЭМП СВЧ по методике, описанной в работах [20, 22]. Осаждение бетулина из упаренного экстракта проведено при добавлении воды. Суберин из проэкстрагированной бересты выделяли методом водно-щелочного гидролиза с использованием гидроксида калия. Условия гидролиза в ЭМП СВЧ установлены по результатам планированного эксперимента с отходами окорки фанерного производства: концентрация водного раствора гидроксида калия (KОН) 5%, гидромодуль ГМ – 1 : 15, мощность облучения 600 Вт [10]. Схема установки приведена в работах [10, 20, 22].

По завершении процесса гидролиза горячий раствор отфильтровывали через тканевый фильтр, осадок (целлолигнин) сушили до постоянной массы. Фильтрат нейтрализовали 1 М HCl до рН 4–6. Выделившийся осадок суберина отфильтровывали, промывали водой до нейтральной реакции и сушили над прокаленным CaCl2 под вакуумом при комнатной температуре до постоянной массы.

В ходе исследования содержания ЭВ и суберина было проведено по два параллельных определения для каждой фракции. Результаты представлены в виде среднего.

Сведения о строении и химическом составе экспериментальных образцов бетулина и суберина из коры березы получены с использованием современных физико-химических методов анализа (ИК- и ЯМР-спектроскопия, ВЭЖХ, ГХ/МС).

Запись ИК-спектров проводилась методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) с использованием ИК-Фурье-спектрометра Vertex 70 (*Bruker*, Германия), оснащенного приставкой НПВО с алмазным кристаллом GladiATR (*Pike Technologies*, США). Условия записи спектров: диапазон 4000–400 см-1; разрешение 4 см-1; число сканирований – 128.

Спектры 1H-ЯМР регистрировались на импульсном ЯМР-спектрометре AVANCE III™ (*Bruker*, Германия), оснащенном сверхпроводящим магнитом Ascend 6001 с рабочей частотой для протонов 600 МГц. Для регистрации спектров применялась стандартная одноимпульсная последовательность. Спектры соединений снимали в DMSO-d6. В качестве внутреннего стандарта использовался 1,3,5-триоксан (не менее 99%, *Aldrich*). Параметры ЯМР-эксперимента: длительность импульса – 10.5 мкс; время регистрации – 3.63 с; задержка – 1 с; ширина спектра – 15 м.д.; число накоплений – 8; температура – 298 К.

Для проведения ГХ/МС анализа навеску пробы растворяли в 1 мл пиридина и центрифугировали. Далее дополнительно проводили дериватизацию, для этого из фугата отбирали аликвоту 50 мкл, смешивали с 50 мкл силилирующего реагента BSTFA и выдерживали при 70 °С в течение 30 мин. После чего реакционную смесь охлаждали в течение 30 мин и проводили дальнейший анализ на приборе CG-MS QP-2010Ultra (*Shimadzu*, Япония).

Условия хроматографирования: колонка капиллярная HP-5ms, диаметр 0.25 мм, толщина неподвижной фазы 0.25 мкм, длина колонки 30 м; ввод пробы с делением потока 1 : 10; температура устройства ввода 280 °С; газ-носитель – гелий; управление потоком газа – постоянное давление; поток через колонку 1 мл/мин; начальная температура термостата 50 °С, изотерма 5 мин; подъем температуры со скоростью 10 °С/мин до 320 °С, изотерма 20 мин; температура устройства сопряжения 280 °С; температура ионного источника 230 °С; энергия ионизации 70 эВ; режим работы масс-детектора: Scan (сканирование диапазона масс); диапазон масс: 50–600 Да.

Определение содержания феруловой кислоты проводили также методом ГХ/МС. Условия пробоподготовки и хроматографирования приведены выше за исключением: режим работы масс-детектора: SIM (запись выбранных ионов); выбранные ионы, m/z: 338, 323, 308.

Для проведения количественного анализа в оптимизированных условиях методом внешнего стандарта построена градуировочная зависимость по концентрациям феруловой кислоты 1, 10 и 100 мкг/мл. По этой зависимости установлен предел обнаружения вещества (по минимальному соотношению сигнал/шум, равному 3) – 0.1 мкг/мл, предел определения (по соотношению сигнал/шум, равному 10) – 0.3 мкг/мл. В качестве стандартного образца использовали коммерчески доступный препарат феруловой кислоты (не менее 99%, *Aldrich*). Всего проведено по три параллельных определения для каждой фракции бересты. Результаты представлены в виде среднего значения с учетом погрешности при заданной доверительной вероятности Р=0.95.

Определение тритерпеновых компонентов в составе бетулина-сырца (метод ВЭЖХ) проводили с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1220 Infinity LC (*Agilent*, США). Система оснащена спектрофотометрическим детектором, автосамплером, насосом с системой формирования градиента на стороне низкого давления, термостатом колонок и вакуумным дегазатором. В качестве неподвижной фазы использовали колонку Zorbax Eclipce Pluse C18 (*Agilent*, США), размер колонки 150·3.0 мм, размер частиц 3.5 мкм. Температура термостата колонки 40 °С. Хроматографирование проводили в изократическом режиме подачи элюентов, соотношение ацетонитрила к воде 95 : 5; объем вводимой пробы 2 мкл; скорость потока 0.6 мл/мин. Детектирование проводилось при длине волны 205 нм.

Для проведения анализа навеску образца 0.001 г растворяли в 1 мл метанола, полученный раствор с концентрацией 1 мг/л использовали для анализа. В качестве стандартных образцов использовали коммерчески доступные препараты бетулина (не менее 98%, *Aldrich*), бетулиновой кислоты (не менее 97%, *Anal. std., Fluka*), эритродиола (не менее 97%, *Anal. std., Fluka*) и лупеола (не менее 90%, *Anal. std., Fluka*) без дополнительной очистки. Все исследования проведены с двумя параллельными определениями, с расчетом средних значений.

## Обсуждение результатов

Содержание ЭВ, извлекаемых 86%-м этиловым спиртом, в отходах окорки березовых балансов составило от 18.3 до 21.9%. Максимальное содержание обнаружено в крупной фракции коры, представляющей собой бересту с минимальными включениями луба. В свежей коре содержание ЭВ достигает 29 [23] или 40% [1], в технической коре фанерного производства – 22% [23], т.е. в отходах окорки значения понижены.

В составе экстрактов всех видов коры и отходов окорки преобладают пентациклические тритерпеноиды, доминирующим компонентом является бетулин (бетулинол) – от 70.3±1.23 до 72.2±1.88% (по данным ВЭЖХ; Р=0.95; n=4) [22].

Установлено, что содержание основного компонента, бетулина, примерно на 2.0% выше в образцах, полученных из крупной фракции отходов окорки ЦБП (3–4.5 мм), также как и содержание основного спутника, лупеола, повышено на 0.7% по сравнению с фракцией 1–3 мм. Этот факт объясняется присутствием луба в мелких фракциях коры, и в т.ч. частично во фракции 1–3 мм, содержащей иные ЭВ, соответственно, снижена доля основных компонентов-тритерпеноидов. Содержание бетулиновой кислоты и эритродиола одинаково во всех фракциях и не превышает в сумме 4.5–4.6%. Присутствие весьма ценного спутника бетулина – лупеола и бетулиновой кислоты в значительных количествах в экстракте нисколько не снижает значимость продукта как источника биологически активных веществ (БАВ).

Композиции, содержащие лупеол, обладают омолаживающим действием. Кроме того, лупеол относят к числу активных цитостатиков; в частности, он выступает как мощный ингибитор рака кожи и ингибитор энтеровируса ЕСНО 6 [24]. Производные бетулина – бетулиновая и бетулоновая кислоты, сукцинаты, ацетаты и другие эфиры органических кислот, проявляют комплекс биологически активных свойств, таких как противоопухолевые, гиполипидемические, гепатопротекторные, противовирусные и другие [2, 3]. Бетулиновая кислота и ее производные относятся к потенциальным препаратам с анти-ВИЧ активностью [25]. Наиболее изученным является ее противоопухолевое действие и главное свойство – высокая цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам и низкая токсичность для организма [26]. В работе [27] обсуждаются полимерные тритерпеновые конструкции с аналогичными свойствами.

Сопоставление состава ЭВ из отходов окорки ЦБП, полученных в этой работе, с литературными данными [1, 28] позволяет сделать заключение о незначительных отклонениях по количественному содержанию компонентов.

Из экстрактов осажден бетулин-сырец с выходом от 5.1 до 16.7% от абс. сух. коры, максимум – из крупной фракции коры. Проведена идентификация продукта по ИК-спектрам, которая показала соответствие структуре бетулина из свежей коры [23, 28].

Из проэкстрагированной коры выделен суберин с выходом от 15.7 до 36.8% от абс. сух. коры. В момент выделения представляет собой порошок коричневого цвета. Кислотное число образцов, полученных из фракций 1–2 мм, 2–3 мм и 3–4.5 мм, имеет сравнительно близкие значения и в среднем составляет 90 мг КOH/г, а из фракции менее 1 мм – 59 мг КOH/г. По литературным источникам кислотное число субериновых кислот близко к 160 [29], следовательно, в эксперименте проведен неполный гидролиз.

Сведения о строении и химическом составе образцов суберина коры березы были получены в данной работе с использованием современных физико-химических методов анализа (ИК- и ЯМР-спектроскопия, ГХ/МС). Установлено, что ИК-спектр образца суберина из отходов окорки балансов ЦБП идентичен спектру продукта из коры, приведенному в [29]; интерпретация выполнена по работе [30].

Полученные 1Н ЯМР-спектры отражают структуру, соответствующую мономерному составу суберина. Согласно спектрам, образцы суберина содержат алифатические метильные протоны (0.5–1 м.д.), алифатические метиленовые группы (1–2.3 и 3–4.9 м.д.), ароматические протоны (6–8 м.д.) и гидроксил карбоксильных групп (12 м.д.). В области 4.1–5 м.д. наблюдается сигнал спиртовых групп. Сигнал с химическим сдвигом 5.3 м.д. отвечает винильным протонам.

Для подробной идентификации соединений, входящих в состав суберина, проведены исследования методом ГХ/МС, при этом суберин предварительно силилировали. Примеры хроматограмм образцов суберина, полученных из фракции коры менее 1 мм (луб) и из фракции 2–3 мм (преимущественно береста) представлены на рисунке 1 в электронном приложении.

Определение компонентов осуществлено сопоставлением времен удерживания пиков на хроматограмме и полных масс-спектров отдельных компонентов с соответствующими данными чистых соединений библиотеки масс-спектров. Все соединения были получены в виде триметилсилиловых эфиров. Примеры идентификации соединений с использованием библиотек масс-спектров NIST-11 и Wiley-10 представлены на рисунках 2 и 3 в электронном приложении; результаты – в таблице 1.

Таблица 1. Мономерный состав образцов суберина

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № пика | Площадь пика, % | Степень совпадения, % | Компонент |
| ***Из фракции менее 1 мм*** | | | |
| 1 | 1.05 | 96 | Глицерин |
| 2 | 2.11 | 84 | 8,10-диоксагептадекан |
| 3 | 1.51 | 93 | D-рибофураноза |
| 4 | 3.60 | 94 | D-ксилоза |
| 5 | 4.08 | 94 | D-ксилоза |
| 6 | 0.44 | 90 | D-рибофураноза |
| 7 | 0.66 | 95 | Гексадекановая (*Пальмитиновая*) кислота |
| 8 | 0.03 | 86 | Феруловая кислота |
| 9 | 1.19 | 94 | Октадекановая (*Стеариновая*) кислота |
| 10 | 8.41 | 85 | 9,12-октадекадиеновая (*Линолевая*) кислота |
| 11 | 3.08 | 78 | Декандиовая (*Себациновая*) кислота |
| 12 | 4.15 | 80 | 17-октадециновая кислота |
| **13** | **47.29** | **74** | **2-Гидроксидекандионовая (*2-гидроксисебациновая*) кислота** |
| **14** | **11.83** | **79** | **2-Гидроксидекандионовая (*2-гидроксисебациновая*) кислота** |
| 15 | 5.37 | 76 | Ланостерол |
| ***Из фракции 2–3 мм*** | | | |
| 1 | 0.33 | 96 | Глицерин |
| 2 | 0.17 | 83 | 8,10-диоксагептадекан |
| 3 | 0.17 | 95 | Гексадекановая (*Пальмитиновая*) кислота |
| 4 | 0.20 | 89 | Феруловая кислота |
| 5 | 0.25 | 94 | Октадекановая (*Стеариновая*) кислота |
| 6 | 9.96 | 84 | 9,12-октадекадиеновая (*Линолевая*) кислота |
| 7 | 2.47 | 70 | Декандиовая (*Себациновая*) кислота |
| 8 | 6.54 | 73 | *Цис*-13,16-Дококадиеновая кислота |
| 9 | 0.68 | 87 | Додекандиовая кислота |
| 10 | 0.46 | 80 | 9,12-октадекадиеновая (*Линолевая*) кислота |
| 11 | 2.19 | 81 | 11,14-Эйкозадиеновая кислота |
| 12 | 1.36 | 84 | 22-гидроксидокозановая (*Феллоновая*) кислота |
| **13** | **31.33** | **72** | **2-Гидроксидекандионовая (*2-гидроксисебациновая)* кислота** |
| 14 | 1.66 | 85 | Додекандиовая кислота |
| **15** | **22.78** | **71** | **2-Гидроксидекандионовая *(2-гидроксисебациновая)* кислота** |
| 16 | 0.64 | 86 | 2-Гидроксидекандионовая *(2-гидроксисебациновая)* кислота |
| 17 | 6.31 | 93 | 22-гидроксидокозановая (*Феллоновая*) кислота |
| 18 | 2.62 | 83 | Додекандиовая кислота |
| 19 | 8.13 | 74 | Циклоартенол |

Примечание. Жирным шрифтом выделены пики с наибольшей интенсивностью.

По результатам таблицы 1 основу компонентного состава суберина из технической березовой коры составляют жирные кислоты, двухосновные карбоновые кислоты, гидроксикислоты, также присутствует феруловая кислота и глицерин, что согласуется с представлением о химической структуре суберина из свежей коры [1]. В следовых количествах обнаружены соединения с низкой молекулярной массой (кислоты, фенолы и циклические соединения). В целом, по мономерному составу экспериментальные образцы существенно отличаются друг от друга. Например, в образце суберина, полученного из мелкой фракции коры, содержится меньше жирных кислот, однако присутствуют моносахориды D-ксилоза, D-рибофураноза – продукты расщепления лигно-углеводного комплекса и гидролиза пентозанов. И в том, и в другом случае обнаружены соединения, относящиеся к классу тритерпеноидов (ланостерол и циклоартенол) – свидетельство активных вторичных метаболических процессов. В исследуемых образцах суберина наибольшую интенсивность имеют пики, соответствующие 2-гидроксидекандионовой кислоте, что следует считать отражением окислительных процессов, сопровождающих выделение суберина.

Известно [4], что 1-алканолы, алкановая и α, ω-алкандионовые кислоты предпочтительно удаляются в мягких щелочных условиях, тогда как ω-гидроксиалкановые кислоты с модифицированной средней длиной цепи – в более сильных щелочных условиях. Насыщенные ω-гидроксиалкановые кислоты содержатся в большом количестве во всех экстрактах суберина. По литературным данным [4], мономеры суберина составляют около 30% экстрактов суберина, нелетучие вещества с высокими значениями Mn представлены больше. Суберин в основном состоит из олигомерных или полимерных алифатических этерифицированных структур, возникающих в результате частичного его расщепления. Было обнаружено, что более 40% экстрагированного суберинового материала являются сшитыми[9].

С использованием метода ГХ/МС в исследуемых образцах суберина установлено количественное содержание одного из компонентов – феруловой кислоты, относящейся к гидроксикоричным кислотам, результаты иллюстрирует таблица 2. Феруловая кислота является биодоступной и обладает широким спектром фармакологических свойств, в частности, отмечено противовоспалительное, антиаллергическое, антиагрегантное, противоопухолевое, антитоксическое, гепатопротекторное, кардиопротекторное, антибактериальное, противовирусное, антидиабетическое действие и др. По механизму действия она имеет преимущества перед некоторыми традиционно известными антиоксидантами, например, аскорбиновой кислотой [31].

Содержание феруловой кислоты в образце суберина из фракции коры 2–3 мм в 4 раза выше, чем в образце из мелкой фракции коры. Этот факт является дополнительным подтверждением целесообразности переработки фракционированной коры с использованием крупной фракции для получения ценных химических продуктов. Для сравнения ее содержание в рисе 0.9%, пшенице 0.66%, ячмене 0.14% (тот же порядок величин), и лишь в отрубях кукурузы достигает 3.1% в пересчете на сухой материал [32].

Таблица 2. Содержание феруловой кислоты в исследуемых образцах суберина (Р=0.95; n=3)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Фракция измельченной коры, мм | № | Содержание феруловой кислоты | | |
| в экстракте, мкг/мл | в сухом материале, г/кг | |
| значения | среднее значение |
| <1 мм | 1 | 17.1 | 2.45 | 2.65±0.52 |
| 2 | 18.4 | 2.63 |
| 3 | 20.1 | 2.87 |
| 2–3 | 1 | 96.6 | 10.50 | 11.27±1.84 |
| 2 | 110.3 | 11.98 |
| 3 | 104.1 | 11.31 |

## Выводы

1. При последовательном извлечении бетулина методом экстракции этиловым спиртом и получении суберина методом водно-щелочного гидролиза предложено использовать ЭМП СВЧ, обеспечивающее многократное сокращение продолжительности обработки.

2. В образцах бетулина-сырца методом ВЭЖХ определено количественное содержание основных компонентов. Содержание тритерпеноидов составляет около 80%, на долю бетулина приходится 70.3–72.1% от а.с.в. экстрактива. Установлено соответствие ИК-спектров бетулина-сырца из технической коры и из свежей коры.

3. Исследована структура и химический состав полученных в ЭМП СВЧ образцов суберина. Проведена идентификация компонентов методами ИК- и ЯМР-спектроскопии. Методом ГХ/МС установлено, что основу компонентного состава суберина из технической березовой коры составляют жирные кислоты, двухосновные карбоновые кислоты, гидроксикислоты (в т.ч. феруловая кислота), доминирует 2-гидроксидекандионовая (*2-гидроксисебациновая*) кислота, что подтверждает представление об известной предполагаемой химической структуре суберина [1].

4. Для химической переработки технической березовой коры – отхода целлюлозно-бумажного производства – рекомендовано получение бетулина и суберина.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета.

## Список литературы

1. Кислицын А.Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение // Химия древесины. 1994. №3. С. 3–28.
2. Толстиков Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстиков А.Г. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность // Химия в интересах устойчивого развития. 2005. Т. 13. №1. С. 1–30.
3. Król S.K., Kiełbus M., Rivero-Müller A., Stepulak A. Comprehensive Review on Betulin as a Potent Anticancer Agent // BioMed Research International. 2015. Vol. 11. Article 584189. DOI: 10.1155/2015/584189.
4. Ferreira R., Garcia H., Sousa A.F., Petkovic M., Lamosa P., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Rebeloa L.P.N., Pereira C.S. Suberin isolation from cork using ionic liquids: characterisation of ensuing products // J. Agric. Food Chem. 2000. Vol. 48 (2). Pp. 383–391. DOI: 10.1021/jf9909398.
5. Кононов Г.И. Химия древесины и ее компонентов. М., 2002. 259 с.
6. Gandini А., Neto C.P., Silvestre A.J.D. Suberin: A promising renewable resource for novel macromolecular materials // Progress in Polymer Science. 2006. Vol. 31. N10. Pp. 878–892. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2006.07.004.
7. Кузнецов Б.Н., Левданский В.А., Кузнецова С.А. Химические продукты из березовой коры. Красноярск, 2012. 260 с.
8. Судакова И.Г., Кузнецов Б.Н., Гарынцева Н.В. Изучение процесса выделения субериновых веществ из бересты березовой коры // Химия растительного сырья. 2008. №1. С. 41–44.
9. Lopes M.H., Gil A.M., Silvestre A.J.D., Neto C.P. Composition of Suberin Extracted upon Gradual Alkaline Methanolysis of Quercus suber L. Cork // J. Agric. Food Chem. 2000. Vol. 48 (2). Pp. 383–391. DOI: 10.1021/jf9909398.
10. Безумова А.В., Третьяков С.И., Кутакова Н.А., Коптелова Е.Н. Извлечение субериновых кислот из бересты при воздействии СВЧ-поля // Химия растительного сырья. 2018. №1. С. 21–28. DOI: 10.14258/jcprm.1304159.
11. А.с. №382657 (СССР). Метод выделения бетулина и суберина / Т.И. Федорищев, В.Г. Калайков. 1973.
12. Патент №2264411 (РФ). Метод извлечения бетулина / Б.Н. Кузнецов, С.А. Кузнецова, А.Г. Михайлов, В.А. Левданский. 20.11.2005.
13. Коптелова Е.Н., Кутакова Н.А., Третьяков С.И. Оптимизация параметров извлечения бетулина из технической коры с использованием ультразвука // Новые достижения в химии и химической технологии растительных материалов: материалы V Всероссийской конференции с международным участием. Барнаул, 2012. С. 165–167.
14. Patent 09/038173 (US). Birch bark processing and isolation of natural products from Birch bark / C. Edwardson, P.A. Krasutsky, R.M. Carlson, I.M. Kolomitsyn, V.V. Nesterenko. 2001.
15. Bai X., Qiu A., Guan J. Optimization of microwave-assisted extraction of antihepatotoxic triterpenoid from Actinidia deliciosa Root and its comparison with conventional extraction methods. Microwave-Assisted Extractions of Triterpenoids // Food Technol. Biotechnol. 2007. Vol. 45 (2). Pp. 174–180.
16. Sánchez-Ávila N., Priego-Capote F., Ruiz-Jiménez J., Luque de Castro M.D. Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction // Talanta. 2009. Vol. 78 (1). Pp. 40–48. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.10.037.
17. Fang X., Wang J., Yu X., Zhang G., Zhao J. Optimization of microwave-assisted extraction followed by RP-HPLC for the simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in the fruits of chaenomeles sinensis // Journal of Separation Science. 2010. Vol. 33 (8). Pp. 1147–1155. DOI: 10.1002/jssc.200900726.
18. Xia E.-Q., Wang B.-W., Xu X.-R., Zhu L., Song Y., Li H.-B. Microwave-assisted extraction of oleanolic acid and ursolic acid from Ligustrum lucidum ait // Int. J. Mol. Sci. 2011. Vol. 12 (8). Pp. 5319–5329. DOI: 10.3390/ijms12085319.
19. Ferreira R., Garcia H., Sousa A.F., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Kunz W., Rebelo L.P.N., Pereira C.S. Microwave-assisted extraction of betulin from birch outer bark // RSC Advance. 2013. Vol. 3 (44). Pp. 21285–21288. DOI: 10.1039/C3RA43868F.
20. Коптелова Е.Н., Кутакова Н.А., Третьяков С.И. Извлечение экстрактивных веществ и бетулина из бересты при воздействии СВЧ-поля // Химия растительного сырья. 2013. №4. С. 159–164. DOI: 10.14258/jcprm.1304159.
21. Alupului A., Călinescu I., Lavric V. Microwave extraction of active principles from medicinal plants // U.P.B. Sci. Bull., Series B. 2012. Vol. 74 (2). Pp. 129–142.
22. Koptelova E.N., Kutakova N.A., Tretjakov S.I., Faleva A.V., Razumov E., Barcík Š. Extraction of betulin from the birch bark balance at pulp and paper production // Wood research. 2020. Vol. 65(5). Pp. 833–841. DOI: 10.37763/wr.1336-4561/65.5.833842.
23. Третьяков С.И., Кутакова Н.А., Коптелова Е.Н., Владимирова Т.М., Богданович Н.И. Бетулин: получение, использование, контроль качества. Архангельск, 2015. 180 с.
24. Казакова О.В., Толстиков Г.А. Медицинские перспективы использования тритерпеноидов лупанового ряда // Химия в интересах устойчивого развития. 2008. Т. 16. №6. С. 727–730.
25. Абышев А.З., Абышев Р.А., Нгуен В.Х., Морозова В.А. Производные бетулинола как перспективные анти-вич агенты // Медицинский академический журнал. 2013. Т. 13 (2). С. 15–32. DOI: 10.17816/MAJ13215-32.
26. Fulda S. Betulinic acid: a natural product with anticancer activity // Molecular Nutrition & Food Research. 2009. Vol. 53 (1). Pp. 140–146. DOI: 10.1002/mnfr.200700491.
27. Горбунова М.Н., Крайнов Г.Ф. Тритерпенсодержашие полимерные конструкции: синтез и биологическая активность // Вестник Пермского научного центра УрО РАН. 2014. №2. С. 44–51.
28. Кузнецова С.А., Скворцова Г.П., Маляр Т.Ю., Скурыдина Е.С., Веселова О.Ф. Выделение бетулина из бересты березы коры и изучение его физико-химических и фармакологических свойств // Химия растительного сырья. 2013. №2. С. 93–100. DOI: 10.14258/jcprm.1302093.
29. Ekman R. The suberin monomers and triterpenoids from the outer bark of Belula verrucosa Ehth. // Holzforschung. 1983. Vol. 37. N4. Pp. 205–211. DOI: 10.1515/hfsg.1983.37.4.205.
30. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений: практическое руководство. М., 1965. 216 с.
31. Kumar N., Vikas Pruthi V. Potential applications of ferulic acid from natural sources // Biotechnology Reports. 2014. Vol. 4. Pp. 86–93. DOI: 10.1016/j.btre.2014.09.002.
32. Mathew S., Abraham T.E. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications // Critical Reviews in Biotechnology. 2004. Vol. 24 (2–3). Pp. 59–83. DOI: 10.1080/07388550490491467.

Поступила в редакцию 14 октября 2021 г.

После переработки 25 ноября 2021 г.

Принята к публикации 27 ноября 2021 г.

**Для цитирования:** Коптелова Е.Н., Кутакова Н.А., Третьяков С.И., Фалева А.В. Анализ продуктов экстракции и водно-щелочного гидролиза технической березовой коры под действием ЭМП СВЧ // Химия растительного сырья. 2022. №1. С. 169–170. DOI: 10.14258/jcprm.20220110473.

*Koptelova Е.N., Kutakova N.A.[[3]](#footnote-3)\*, Tretjakov S.I., Faleva A.V.* ANALYSIS OF EXTRACTION PRODUCTS AND WATER-ALKALINE HYDROLYSIS OF TECHNICAL BIRCH BARK UNDER THE ACTION OF MICROWAVE EMF

Northern Arctic Federal University named after M.V. Lomonosov, nab. Severnoy Dviny, 17, Archangelsk, 163002 (Russia), e-mail: n.kutakova@narfu.ru

Research has been carried out on the separation of betulin and suberin from the debarking waste of the pulpwood of the Arkhangelsk PPM, crushed on an abrasive crusher. The extraction of betulin from various fractions of technical bark was carried out by the method of extraction with 86% ethyl alcohol using microwave EMF (microwave extraction). Suberin was isolated from the extracted bark by hydrolysis with an aqueous solution of KOH also under microwave heating conditions. The maximum yield of betulin and suberin is achieved when using coarse bark fractions (3–4.5 mm), which are crushed birch bark.

The resulting products were identified by IRS, NMR, and GC with mass spectrometry (GC/MS). The quantitative content of components in bark extracts was determined by HPLC analysis. The triterpenoid betulinol (70–72%) predominates in the composition of extractives, betulinic acid, lupeol, and erythrodiol are less represented. Fatty, dibasic carboxylic acids and hydroxy acids were identified in the composition of suberin monomers, 2-hydroxydecanedionic (*2-hydroxysebacic*) acid dominates. The quantitative content of ferulic acid, a natural antioxidant, was determined in the product from different fractions of the bark (from 2.65 to 11.27 g/kg). Suberin obtained from small fractions of the bark differs from suberin from large fractions in composition. Ribofuranose and xylose were found in the product from the 1–2 mm bark fraction, but absent in the product from the 2–3 mm fraction; lanosterol is present in suberin from the small fraction of the bark, cycloartenol from the large one.

*Keywords:* birch bark, betulin, suberin, microwave extraction, water-alkaline hydrolysis, microwave EMF, HPLC, GC/MS.

References

1. Kislitsyn A.N. *Khimiya drevesiny*, 1994, no. 3, pp. 3–28. (in Russ.).
2. Tolstikov G.A., Flekhter O.B., Shul'ts E.E., Baltina L.A., Tolstikov A.G. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya*, 2005, vol. 13, no. 1, pp. 1–30. (in Russ.).
3. Król S.K., Kiełbus M., Rivero-Müller A., Stepulak A. *BioMed Research International*, 2015, vol. 11, article 584189. DOI: 10.1155/2015/584189.
4. Ferreira R., Garcia H., Sousa A.F., Petkovic M., Lamosa P., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Rebeloa L.P.N., Pereira C.S. *J. Agric. Food Chem*., 2000, vol. 48 (2), pp. 383–391. DOI: 10.1021/jf9909398.
5. Kononov G.I. *Khimiya drevesiny i yeye komponentov*. [Chemistry of wood and its components]. Moscow, 2002, 259 p. (in Russ.).
6. Gandini А., Neto C.P., Silvestre A.J.D. *Progress in Polymer Science*, 2006, vol. 31, no. 10, pp. 878–892. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2006.07.004.
7. Kuznetsov B.N., Levdanskiy V.A., Kuznetsova S.A. *Khimicheskiye produkty iz berezovoy kory*. [Chemical products from birch bark]. Krasnoyarsk, 2012, 260 p. (in Russ.).
8. Sudakova I.G., Kuznetsov B.N., Garyntseva N.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2008, no. 1, pp. 41–44. (in Russ.).
9. Lopes M.H., Gil A.M., Silvestre A.J.D., Neto C.P. *J. Agric. Food Chem*., 2000, vol. 48 (2), pp. 383–391. DOI: 10.1021/jf9909398.
10. Bezumova A.V., Tret'yakov S.I., Kutakova N.A., Koptelova Ye.N. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 1, pp. 21–28. DOI: 10.14258/jcprm.1304159. (in Russ.).
11. Patent 382657 (USSR). 1973. (in Russ.).
12. Patent 2264411 (RU). 20.11.2005. (in Russ.).
13. Koptelova Ye.N., Kutakova N.A., Tret'yakov S.I. *Novyye dostizheniya v khimii i khimicheskoy tekhnologii rastitel'-nykh materialov: Materialy V Vserossiyskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem*. [New achievements in chemistry and chemical technology of plant materials: Proceedings of the V All-Russian Conference with international participation]. Barnaul, 2012, pp. 165–167. (in Russ.).
14. Patent 09/038173 (US). 2001.
15. Bai X., Qiu A., Guan J. *Food Technol. Biotechnol*., 2007, vol. 45 (2), pp. 174–180.
16. Sánchez-Ávila N., Priego-Capote F., Ruiz-Jiménez J., Luque de Castro M.D. *Talanta*, 2009, vol. 78 (1), pp. 40–48. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.10.037.
17. Fang X., Wang J., Yu X., Zhang G., Zhao J. *Journal of Separation Science*, 2010, vol. 33 (8), pp. 1147–1155. DOI: 10.1002/jssc.200900726.
18. Xia E.-Q., Wang B.-W., Xu X.-R., Zhu L., Song Y., Li H.-B. *Int. J. Mol. Sci*., 2011, vol. 12 (8), pp. 5319–5329. DOI: 10.3390/ijms12085319.
19. Ferreira R., Garcia H., Sousa A.F., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Kunz W., Rebelo L.P.N., Pereira C.S. *RSC Advance*, 2013, vol. 3 (44), pp. 21285–21288. DOI: 10.1039/C3RA43868F.
20. Koptelova Ye.N., Kutakova N.A., Tret'yakov S.I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2013, no. 4, pp. 159–164. DOI: 10.14258/jcprm.1304159. (in Russ.).
21. Alupului A., Călinescu I., Lavric V. *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, 2012, vol. 74 (2), pp. 129–142.
22. Koptelova E.N., Kutakova N.A., Tretjakov S.I., Faleva A.V., Razumov E., Barcík Š. *Wood research*, 2020, vol. 65(5), pp. 833–841. DOI: 10.37763/wr.1336-4561/65.5.833842.
23. Tret'yakov S.I., Kutakova N.A., Koptelova Ye.N., Vladimirova T.M., Bogdanovich N.I. *Betulin: polucheniye, ispol'zovaniye, kontrol' kachestva*. [Betulin: production, use, quality control]. Arkhangel'sk, 2015, 180 p. (in Russ.).
24. Kazakova O.V., Tolstikov G.A. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya*, 2008, vol. 16, no. 6, pp. 727–730. (in Russ.).
25. Abyshev A.Z., Abyshev R.A., Nguyen V.Kh., Morozova V.A. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal*, 2013, vol. 13(2), pp. 15–32. DOI: 10.17816/MAJ13215-32. (in Russ.).
26. Fulda S. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009, vol. 53 (1), pp. 140–146. DOI: 10.1002/mnfr.200700491.
27. Gorbunova M.N., Kraynov G.F. *Vestnik Permskogo nauchnogo tsentra UrO RAN*, 2014, no. 2, pp. 44–51. (in Russ.).
28. Kuznetsova S.A., Skvortsova G.P., Malyar T.Yu., Skurydina Ye.S., Veselova O.F. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2013, no. 2, pp. 93–100. DOI: 10.14258/jcprm.1302093. (in Russ.).
29. Ekman R. *Holzforschung*, 1983, vol. 37, no. 4, pp. 205–211. DOI: 10.1515/hfsg.1983.37.4.205.
30. Nakanisi K. *Infrakrasnyye spektry i stroyeniye organicheskikh soyedineniy: prakticheskoye rukovodstvo*. [Infrared spectra and structure of organic compounds: a practical guide]. Moscow, 1965, 216 p. (in Russ.).
31. Kumar N., Vikas Pruthi V. *Biotechnology Reports*, 2014, vol. 4, pp. 86–93. DOI: 10.1016/j.btre.2014.09.002.
32. Mathew S., Abraham T.E. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2004, vol. 24 (2–3), pp. 59–83. DOI: 10.1080/07388550490491467.

Received October 14, 2021

Revised November 25, 2021

Accepted November 27, 2021

**For citing:** Koptelova Е.N., Kutakova N.A., Tretjakov S.I., Faleva A.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2022, no. 1, pp. 169–177. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20220110473.

1. \*Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprm.20220110473s [↑](#footnote-ref-1)
2. \*\* Автор, с которым следует вести переписку. [↑](#footnote-ref-2)
3. \* Corresponding author. [↑](#footnote-ref-3)