Химия растительного сырья. 2025. №4. OnLine First.
Khimiya rastitel'nogo syr'ya, 2025, no. 4, OnLine First.
DOI: 10.14258/jcprm.20250417353

УДК 547.597:547.918

# РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ 3-О-ФОРМИАТА АЛЛОБЕТУЛИНА ИЗ БЕРЕСТЫ БЕРЕЗЫ И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ВЛИЯНИЯ НА КОАГУЛЯЦИЮ КРОВИ/ПЛАЗМЫ

© *Е.С. Скурыдина[1], С.А. Кузнецова[1*], Н.Н. Дрозд[2], Б.Н. Кузнецов[1,3]*

*[1] Институт химии и химической технологии СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок, 50/24, Красноярск, 660036, Россия, kuznetssvetl@yandex.ru*
*[2] Национальный медицинский исследовательский центр гематологии, Новый Зыковский проезд, 4а, Москва, 125167, Россия*
*[3] ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок, 50/24, Красноярск, 660036, Россия*

Целью данного исследования являлась разработка нового способа синтеза 3-О-формиата аллобетулина непосредственно из бересты березы и изучение его влияния на коагуляцию крови/плазмы. Предложен новый одностадийный способ синтеза 3-О-формиата аллобетулина из бересты берёзы *Betula Pendula* Roth., основанный на совмещении экстракции бетулина из бересты, его изомеризации в аллобетулин в присутствии катализатора ортофосфорной кислоты и этерификации аллобетулина муравьиной кислотой. Установлено влияние продолжительности процесса обработки бересты муравьиной кислотой и содержания $H_3PO_4$ на выход 3-О-формиата аллобетулина. Наибольший выход неочищенного 3-О-формиата аллобетулина (37% от массы а.с.б.) достигается при продолжительности процесса 12 ч в присутствии 10% $H_3PO_4$, а также при продолжительности 16 ч в присутствии 8% $H_3PO_4$. Выход перекристаллизованного из этанола 3-О-формиата аллобетулина составляет около 30% от массы а.с.б. Состав полученных образцов перекристаллизованного 3-О-формиата аллобетулина определен методом элементного анализа, а его строение подтверждено методами ИК- и ЯМР-спектроскопии.

В экспериментах *in vitro*, проведенных с использованием донорской крови человека, показано, что 3-О-формиат аллобетулина проявляет выраженные прокоагулянтные свойства и не оказывают значимого влияния на мембрану эритроцитов. 3-О-формиат аллобетулина может быть использован для создания биоматериалов с прокоагулянтными свойствами.

*Ключевые слова*: береста березы, бетулин, аллобетулин, 3-О-формиат аллобетулина, муравьиная кислота, коагуляция крови/плазмы.

**Для цитирования:** Скурыдина Е.С., Кузнецова С.А., Дрозд Н.Н., Кузнецов Б.Н. Разработка способа получения 3-О-формиата аллобетулина из бересты березы и изучение его влияния на коагуляцию крови/плазмы // Химия растительного сырья. 2025. №4. OnLine First. https://doi.org/10.14258/jcprm.20250417353.

## *Введение*

Внешняя кора различных видов берез содержит такие классы природных соединений, как терпеноиды, аминокислоты, эфирные масла, сапонины, дубильные вещества, углеводы, флавоноиды и др. Основными компонентами внешней коры *Betula Pendula Roth.,* произрастающей в европейской части России и Сибири, являются пентациклические тритерпеноиды, такие как бетулин, лупеол, аллобетулин, бетулиновая кислота и др. Содержание тритерпенового спирта – бетулина в бересте *Betula Pendula Roth.* варьируется, в зависимости от условий произрастания березы от 10 до 45% [1–5].

Известно, что бетулин обладает гастро- и гепатопротекторными, противовоспалительными, антибактериальными, противоопухолевыми и другими фармакологическими свойствами [5–9]. Наряду с бетулином, проявляющим широкий спектр биологической активности, все большее распространение получают его полусинтетические производные. Основные модификации бетулина, которые синтезированы в настоящее время и тестируются на биологическую активность, являются производными, полученными путем превращения ОН-групп при 3 и 28 атомах углерода [10–13].

* Автор, с которым следует вести переписку.

Большинство методов синтеза эфиров бетулина основано на прямой этерификации чистого вещества соответствующими органическими кислотами или их хлорангидридами. С высоким выходом получаются моно- и диэфиры с глутаровой, камфолевой, *n*-метоксикоричной, никотиновой, О-ацетилсалициловой, фталиевой и янтарной кислотами, а также с дикарбоновыми кислотами [14, 15]. В работах [16, 17] представлены простые одностадийные способы получения диацильных производных бетулина из внешней коры березы, основанные на совмещении стадий экстракции бетулина из бересты и его этерификации соответствующими кислотами.

Авторами работы [18] отмечено, что при длительном кипячении бересты в избытке муравьиной кислоты получают диформиат бетулина с выходом 40% и 3-О-формиат аллобетулина с выходом до 10%. Основным продуктом взаимодействия бетулина, содержащегося в бересте, и муравьиной кислоты является диэфир бетулина, а выход 3-О-формиата аллобетулина почти в 4 раза ниже. 3-О-формиат аллобетулина – эфир аллобетулина и муравьиной кислоты обладает лучшими антиоксидантными свойствами, чем известный антиоксидант тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота – водорастворимый аналог витамина Е) и исходный аллобетулин [19].

Цель данной работы – разработка нового одностадийного способа синтеза 3-О-формиата аллобетулина из бересты березы, подбор оптимальных условий синтеза и изучение его влияния на коагуляцию крови/плазмы.

### *Методики эксперимента и физико-химические методы исследования*

Исходным сырьем являлась береста берёзы *Betula Pendula Roth.,* заготовленная в окрестностях Красноярска и фракционированная до частиц размером 2–5. Фракционированную бересту высушивали при 105 °С до влажности менее 1%. Химический состав бересты *Betula Pendula Roth.* (% от массы абсолютно сухой бересты (а.с.б.)): бетулин 37.0; суберин 38.7; целлюлоза 3.4; лигнин 13.4; трудногидролизуемые полисахариды 5.8; зола 2.1 [3].

Бетулин, используемый при проведении исследований по воздействию на коагуляцию крови человека, получали по методике, описанной в работе [5]. В экспериментах использовали муравьиную (ООО «Химтрейд») и ортофосфорную кислоты (АО «Химреактивснаб», ГОСТ 6552-80 с изм. 1, 2) без дополнительной очистки.

3-О-формиат аллобетулина получали непосредственно из бересты березы путём её кипячения в муравьиной кислоте в присутствии $H_3PO_4$ (рис. 1), которая является катализатором процесса изомеризации бетулина в аллобетулин [20].

Навеску 10 г воздушно-сухой бересты коры березы помещали в круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, добавляли 250 мл 85%-ной муравьиной кислоты, катализатор $H_3PO_4$ и кипятили при температуре 105–110 °С. Содержание ортофосфорной кислоты в растворе варьировали от 3 до 12%. Продолжительность процесса экстракции составляла от 4 до 16 ч. По окончании процесса проводили горячее фильтрование реакционной массы и отгоняли муравьиную кислоту из фильтрата до 1/3 объема. Концентрат выливали в пятикратный объем дистиллированной воды, полученный осадок 3-О-формиата аллобетулина-сырца отфильтровывали, промывали на фильтре до нейтральной реакции промывных вод, высушивали при комнатной температуре до постоянной массы. Полученный неочищенный эфир аллобетулина перекристаллизовывали из этанола с применением активированного угля марки ОУ-Г.

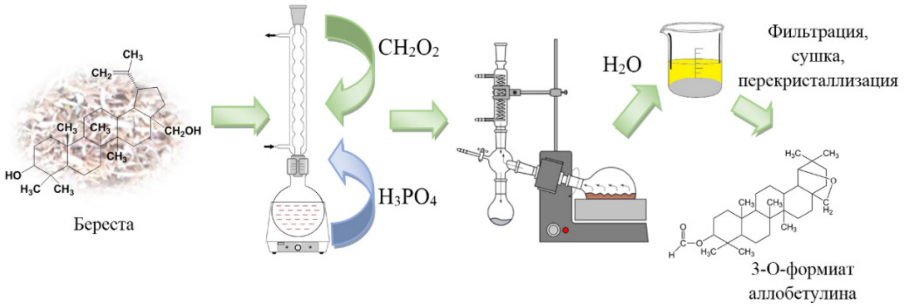


Рис. 1. Схема получения 3-О-формиата аллобетулина из бересты *Betula Pendula Roth.*

Элементный анализ перекристаллизованного 3-О-формиата аллобетулина выполняли на элементном анализаторе Flash EA™-1112 (Thermo Quest Italia) с одновременным определением количества (в %) C, O, N, S и H.

Измерение температуры плавления перекристаллизованного 3-О-формиата аллобетулина проводили с использованием прибора Electrothermal A9100.

ИК-спектры сняты с использованием ИК-Фурье спектрометра Tensor 27 (Bruker, Германия) в диапазоне волновых чисел 400–4000 $см^{-1}$. Образцы для съемки ИК-спектров готовили прессованием с бромистым калием. Навеска исследуемого вещества составляла 2–3 мг вещества на 1000 мг KBr. Обработку спектров проводили с использованием пакета программ OPUS версии 5.5.

ЯМР-спектры перекристаллизованного 3-О-формиата аллобетулина получены с использованием прибора Bruker Avance III 600 при комнатной температуре в среде дейтерированного хлороформа ($CDCl_3$). $^1$H-спектр записан с использованием одиночного импульса на рабочей частоте 600 МГц с задержкой релаксации 6.5 мкс. $^{13}C\{^1H\}$-спектр с развязкой от протонов записан на рабочей частоте 150 МГц с задержкой релаксации 6.5 мкс, с накоплением 512 сканов в течение 19 ч. Для записи всех спектров использовались стандартные импульсные последовательности из библиотеки Bruker, включая двухмерные эксперименты HSQC и HMBC. Все спектры обработаны с использованием программного пакета Topspin 3.2.

*Фармакологические методы исследования.* Влияние образцов на время свертывания цельной крови человека в тесте времени рекальцификации крови (ВРК) оценивали в соответствии с описанием метода в публикации Gulliani G.L. и др. [21]: к 0.1 мл цитратной крови (отбирали из пробирки после инкубации 10 мин / 20 мин с взвесью бетулина / 3-О-формиата аллобетулина в концентрации 10 мг/мл) добавляли 0.1 мл раствора 0.02 М хлорида кальция (Sigma Aldrich) и фиксировали время (с) появления сгустка.

Влияние образцов на гемолиз эритроцитов определяли по методу [22]. Кровь центрифугировали (250*g*, 15 мин) и трижды отмывали эритроциты в физиологическом растворе (ФР). Пробирку с суспензией эритроцитов (1 мл), содержащей исследуемые соединения (0.01–10 мг/мл), помещали в термостат (Thermo Block TDB-120; Biosan) при 37 °C. Через 2 ч пробирки центрифугировали (250*g*, 15 мин). Оптическую плотность (ОП) надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования, определяли при длине волны 540 нм (спектрофотометр Smart Spec Plus; Bio-Rad). Степень гемолиза (СГ, %) рассчитывали по следующей формуле: $СГ=(ОП_О-ОП_{(К-)}/ОП_{(К+)}-ОП_{(К-)})\times100\%$, где, $ОП_О$ – ОП надосадочной жидкости после инкубации с образцами; $ОП_{(К-)}$ – ОП надосадочной жидкости после инкубации с ФР; $ОП_{(К+)}$ – ОП надосадочной жидкости после инкубации с дистиллированной водой.

Статистическую обработку полученных результатов по прокоагулянтной активности исследуемых образцов проводили с использованием программ Primer of Biostatistics 4.03 (The Mc Graw-Hill Companies, Inc.) и Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Для сравнения ненормально распределённых данных применяли непараметрический U критерий Манна-Уитни. Данные представлены в виде медианы (Q1; Q3) от 4–16 независимых определений. Статистически значимыми считали различия между рядами данных при $p<0.05$.

Доноры крови давали письменное информированное согласие на взятие и использование крови в ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России (Москва). Кровь для исследования получали в период с 16.05.2023 по 13.09.2023.

### *Результаты и обсуждение*

Одностадийный процесс синтеза 3-О-формиата аллобетулина совмещает стадии изомеризации бетулина в аллобетулин, катализируемого $H_3PO_4$ и этерификации аллобетулина муравьиной кислотой (рис. 2).

Изучено влияние продолжительности обработки бересты коры березы кипящей муравьиной кислотой и содержания катализатора $H_3PO_4$ в реакционной среде на выход 3-О-формиата аллобетулина-сырца (рис. 3).

Осуществлен подбор оптимальных условий синтеза 3-О-формиата бетулина из бересты коры березы (температура – 105–110 °C, концентрация $H_3PO_4$ – 10%, продолжительность процесса – 12 ч), обеспечивающих наиболее высокий выход неочищенного продукта (37% от массы абс. сух. бересты).

Примерно такой же выход 3-О-формиата аллобетулина сырца был получен при концентрации $H_3PO_4$ 8% и продолжительности обработки бересты 16 ч (рис. 3). Поскольку содержание бетулина в бересте не превышает 37% от массы абс. сух. бересты, можно сделать вывод о достижении в этих условиях максимально возможного выхода 3-О-формиата аллобетулина и о нецелесообразности дальнейшего увеличения продолжительности процесса и концентрации $H_3PO_4$.

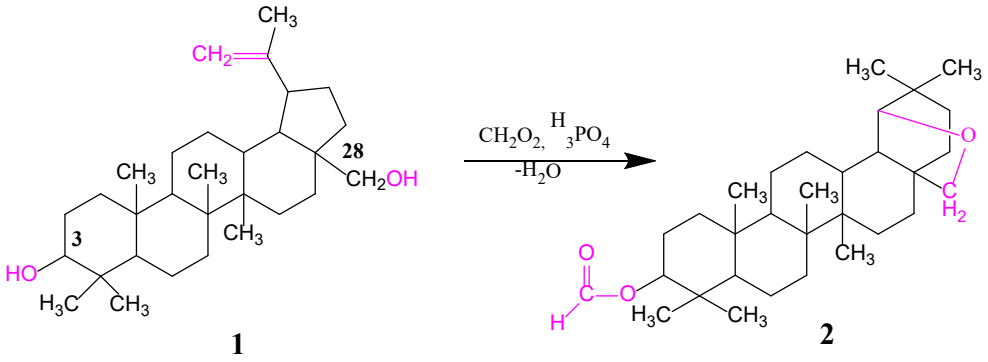


Рис. 2. Схема получения 3-О-формиата аллобетулина (2) из содержащегося в бересте березы бетулина (1)

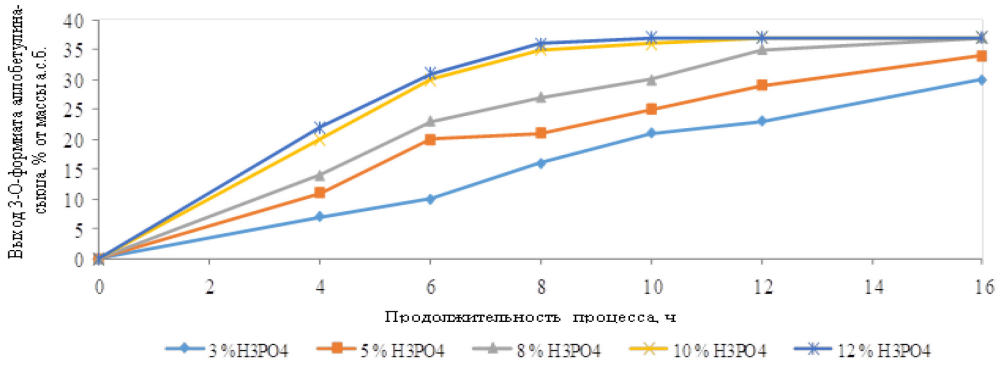


Рис. 3. Влияние продолжительности обработки бересты кипящей муравьиной кислотой и содержания катализатора $H_3PO_4$ на выход 3-О-формиата аллобетулина-сырца

После перекристаллизации 3-О-формиата аллобетулина-сырца из этанола получены белые кристаллы с температурой плавления 310 °С, что соответствует литературным данным [18]. Максимальный выход перекристаллизованного 3-О-формиата аллобетулина составляет 30% от массы абс. сух. бересты.

На основании данных элементного анализа перекристаллизованного 3-О-формиата аллобетулина найдено, %: (С) 78.3; (Н) 10.7; (О) 12.7. Вычислено ($C_{31}H_{50}O_3$), %: (С) 79.2; (Н) 10.6; (О) 10.2.

В ИК-спектре 3-О-формиата аллобетулина, в отличие от ИК-спектра бетулина, отсутствует полоса поглощения спиртового гидроксила в области 3500 см$^{-1}$ и появляется новый пик при 1724 см$^{-1}$, соответствующий карбонильной группе (С=О), что указывает на образование эфирной связи. На образование эфирной связи также указывает наличие полосы поглощения при 1173 см$^{-1}$ (С-О-С). В спектре отсутствуют характерные для бетулина полосы поглощения при 1640 см$^{-1}$ и 800 см$^{-1}$.

В спектре $^1$Н ЯМР ($CDCl_3$, δ, м.д.): присутствуют сигналы при 0.82 (s, 3H, $CH_3$), 0.88 (s, 3H, $CH_3$), 0.89 (s, 3H, $CH_3$), 0.93 (s, 3H, $CH_3$), 0.95 (s, 3H, $CH_3$), 0.98 (s, 3H, $CH_3$), 1.06 (s, 3H, $CH_3$), 3.41 (d, 1H, J 7.6, 28-Ha), 3.56 (s, 1H, 19a-H), 3.75 (d, 1H, J 7.6, 28-Hb), 4.63 (m, 1H, 3a-H), 8,09 (s, 1H, 3b-COH) и др.

В спектре $^{13}$С ЯМР ($CDCl_3$, δ, м.д.): присутствуют сигналы при 161.25 (HCOH), 87.97 (C19), 81.09 (C3), 69.26 (C28), 55.58 (C5), 51.02 (C9), 46,84 (C18), 41.48 (C), 40.75 (C), 40.65 (C), 38.59 (C1), 37.78 (C4), 37.18 (C10), 36.72 (C16), 36.28 (C17), 34.15 (C13), 33.85 (C7), 32.73 (C21), 28.82 и 24.54 (C-29 или C-30) и др.

Во ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России была выполнена оценка *in vitro* гемосовместимости образцов 3-О-формиата аллобетулина и бетулина.

По результатам исследования их влияния на время свертывания донорской крови в тесте ВРК (времени рекальцификации крови) определено, что инкубация крови 10 мин со взвесью образцов в концентрации в течение 10 мг/мл приводила к достоверному сокращению времени коагуляции в тесте ВРК, по сравнению с контролем в 2.76 и в 1.96 раза соответственно для бетулина и 3-О-формиата аллобетулина (табл. 1). Через 20 мин инкубации с бетулином отмечали достоверное сокращение времени коагуляции в 2.18 раза

в сравнении с контролем 20 мин. Однако достоверных различий между показаниями для бетулина 63.75 с (53.40; 97.38) и 3-О-формиата аллобетулина 98.29 с (76.52; 128.73) не наблюдали (табл. 1).

Оптическая плотность раствора после гемолиза эритроцитов в результате инкубации с бетулином или 3-О-формиатом аллобетулина в концентрациях 0.01, 0.1, 1 мг/мл достигала 0.12 (0.09; 0.14) отн. ед – 0.20 (0.15; 0.22) отн. ед. и 0.12 (0.08; 0.16) отн. ед – 0.14 (0.08; 0.23) отн. ед. соответственно (табл. 2). Степень гемолиза при инкубации взвеси эритроцитов с бетулином или 3-О-формиатом аллобетулина в концентрациях 0.01, 0.1, 1 мг/мл составила 0 (0; 0.59) % – 0.26 (0.07; 0.62) % и 0 (0; 0) % – 0.47 (0; 1.36) % соответственно.

Показано, что инкубация взвеси эритроцитов с бетулином или 3-О-формиата аллобетулина в концентрациях 0.01; 0.1 и 1 мг/мл не приводила к значимому изменению оптической плотности по сравнению с контролем. Степень гемолиза при инкубации взвеси эритроцитов с бетулином и 3-О-формиата аллобетулина в указанных концентрациях не превышала 0.26 (0.07; 0.62) % и 0.47 (0; 1.36) % соответственно (табл. 2).

Низкая степень гемолиза соединений предполагает, что мембранам эритроцитов наносят незначительные повреждения, что улучшает совместимость с компонентами крови. Бетулин и 3-О-формиат аллобетулина могут считаться безопасными для применения в качестве будущих компонентов биоматериалов.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* показано, что бетулин и 3-О-формиат аллобетулина проявляют прокоагулянтные свойства. Эфир аллобетулина и муравьиной кислоты оказывает такое же прокоагулянтное действие, как и бетулин.

Таблица 1. Влияние инкубации взвесей (10 мг/мл) бетулина и 3-О-формиата аллобетулина с кровью на коагуляцию в тесте ВРК (с)

| Образцы | Время инкубации взвеси с кровью, мин | | |
|---|---|---|---|
| | 0 мин | 10 мин | 20 мин |
| Контроль с ФР | 152.03 (147.55; 164.98) | 151.88 (143.38; 159.98) | 139.10 (131.80; 156.85) |
| Бетулин | 125.82 (81.32; 154.68) | 55.00* (42.35; 61.05) | 63.75** (53.40; 97.38) |
| 3-О-формиат аллобетулина | 113.5 (72.58; 148.13) | 77.58* (69.08; 104.54) | 98.29** (76.52; 128.73) |

Примечание: ФР – физиологический раствор; * $p<0.05$ достоверность различий с показаниями в контроле с буфером, 10 мин; ** $p<0.05$ достоверность различий с показаниями в контроле с буфером, 20 мин.; n=4.

Таблица 2. Влияние инкубации бетулина и 3-О-формиата аллобетулина с взвесью эритроцитов на оптическую плотность (λ=545 нм) раствора, полученного после центрифугирования

| Образцы | Концентрация образцов, мг/мл взвеси эритроцитов | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 |
| Бетулин | 0.12 (0.09; 0.14) | 0.20 (0.15; 0.22) | 0.13 (0.09; 0.33) | 0.48* (0.45; 0.52) |
| 3-О-формиат аллобетулина | 0.12 (0.08; 0.16) | 0.14 (0.08; 0.23) | 0.14 (0.13; 0.15) | 0.46* (0.41; 0.52) |

Примечание: Оптическая плотность К ”+” с водой – 4 (4; 4) отн. ед.; Оптическая плотность для К “-“ с ФР – 0.16 (0.12; 0.21) отн. ед.; * $p<0.05$ достоверность различий с показаниями в контроле с ФР; n=4–16.

***Выводы***

Разработан новый одностадийный способ синтеза 3-О-формиата аллобетулина непосредственно из бересты коры березы, основанный на совмещении стадий экстракции бетулина из бересты, его изомеризации в аллобетулин присутствии катализатора ортофосфорной кислоты и этерификации аллобетулина муравьиной кислотой. Наиболее высокий выход неочищенного 3-О-формиата аллобетулина составил ~37% от массы абс. сух. бересты. Выход перекристаллизованного из этанола 3-О-формиата аллобетулина составляет около 30% от массы абс. сух. бересты.

Состав 3-О-формиата аллобетулина после перекристаллизации из этанола определен методом элементного анализа, а его строение подтверждено методами ИК- и ЯМР-спектроскопии.

В экспериментах *in vitro*, проведенных с использованием донорской крови человека показано, что 3-О-формиат аллобетулина проявляет выраженные прокоагулянтные свойства и не оказывают значимого влияния на мембрану эритроцитов. 3-О-формиат аллобетулина может быть использован для создания биоматериалов с прокоагулянтными свойствами.

**Финансирование**
*Химические исследования выполнены в рамках государственного задания ИХХТ СО РАН ФИЦ КНЦ СО РАН (проект FWES-2021-0017). В работе использовано оборудование Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.*
*Биологические исследования выполнены в рамках договора № 1/С-2022 от 19.12.2022 г. о сотрудничестве в сфере научно-исследовательской деятельности между ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России (Москва) и ИХХТ СО РАН ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск).*

**Конфликт интересов**
*Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.*

**Открытый доступ**
*Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.*

## *Список литературы*

1. Räsänen R.M., Hieta J.P., Immanen J., Nieminen K., Haavikko R., Yli-Kauhaluoma J., Kauppila T.J. Chemical profiles of birch and alder bark by ambient mass spectrometry // Analytical and bioanalytical chemistry. 2019. Vol. 411. Pp. 7573–7583. https://doi.org/10.1007/s00216-019-02171-9.
2. Hemingway R.W. Bark: Its chemistry and prospects for chemical utilization // Organic chemicals from biomass. CRC Press, 2018. Pp. 189–248.
3. Кузнецов Б.Н., Левданский В.А., Кузнецова С.А. Химические продукты из древесной коры. Монография. Красноярск, 2012. 260 с.
4. Takibayeva A.T., Zhumabayeva G.K., Bakibaev A.A., Demets O.V., Lyapunova M.V., Mamaeva E.A., Yerkassov R.Sh., Kassenov R.Z., Ibrayev M.K. Methods of analysis and identification of betulin and its derivatives // Molecules. 2023. Vol. 28, no. 16. 5946. https://doi.org/10.3390/molecules28165946.
5. Kuznetsova S.A., Skvortsova G.P., Maliar I.N., Skurydina E.S., Veselova O.F. Extraction of betulin from birch bark and study of its physico-chemical and pharmacological properties // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2014. Vol. 40. Pp. 742–747. https://doi.org/10.1134/S1068162014070073.
6. Adepoju F.O., Duru K.C., Li E., Kovaleva E.G., Tsurkan M.V. Pharmacological potential of betulin as a multitarget compound // Biomolecules. 2023. Vol. 13, no. 7. 1105. https://doi.org/10.3390/biom13071105.
7. Ren L., Niu S., Sun Y., Liang Y., Zhao J., Zhang T., Zhang J. Anti-inflammatory action of betulin and its potential as a dissociated glucocorticoid receptor modulator // Food and Chemical Toxicology. 2021. Vol. 157. 112539. https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112539.
8. Madej M., Gola J., Chrobak E. Synthesis. Pharmacological Properties, and Potential Molecular Mechanisms of Antitumor Activity of Betulin and Its Derivatives in Gastrointestinal Cancers // Pharmaceutics. 2023. Vol. 15, no. 12. 2768. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122768.
9. Bębenek E., Chrobak E., Piechowska A., Głuszek S., Boryczka S. Betulin: A natural product with promising anticancer activity against colorectal cancer cells // Medical Studies/Studia Medyczne. 2020. Vol. 36, no. 4. Pp. 298–302. https://doi.org/10.5114/ms.2020.102324.
10. 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. https://doi.org/10.14258/jcprm.2019045419.
11. Amiri S., Dastghaib S., Ahmadi M., Mehrbod P., Khadem F., Behrooj H., Aghanoori M.-R., Machaj F., Ghamsari M., Rosik J., Hudecki A., Askami A., Hasemi M., Los M.J., Makkaram P, Madrakian T., Ghavami S. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects // Biotechnology advances. 2020. Vol. 38. 107409. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.008.
12. Drąg-Zalesińska M., Borska S. Betulin and its derivatives–precursors of new drugs // World Scientific News. 2019. Vol. 127, no. 3. Pp. 123–138.
13. Chrobak E., Świtalska M., Wietrzyk J., Bębenek E. Synthesis, Structure, and In Vitro Biological Evaluation of Semi-Synthetic Derivatives of Betulin // Applied Sciences. 2024. Vol. 14(21). 9970. https://doi.org/10.3390/app14219970.
14. Pinzaru I., Trandafirescu C., Szabadai Z., Mioc M., Ledeti I., Coricovac D., Ciurlea S., Ghiulai R.M., Crainiceanu Z., Simu G. Synthesis and biological evaluation of some pentacyclic lupane triterpenoid esters // Rev. Chim. 2014. Vol. 65. Pp. 848–851.
15. Pęcak P., Orzechowska B., Chrobak E., Boryczka S. Novel betulin dicarboxylic acid ester derivatives as potent antiviral agents: Design, synthesis, biological evaluation, structure-activity relationship and in-silico study // European Journal of Medicinal Chemistry. 2021. Vol. 225. 113738. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113738.
16. Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Скворцова Г.П., Скурыдина Е.С., Калачева Г.С. Влияние условий ацетилирования и предварительной обработки бересты коры берёзы на выход и состав тритерпеновых продуктов // Журнал СФУ. Химия. 2010. Т. 3 (2). С. 174–182.

17. Кузнецова С.А., Скворцова Г.П., Скурыдина Е.С., Маляр Ю.Н., Ханчич О.А. Влияние условий ацилирования пропионовой кислотой бересты коры берёзы и её активации на выход и состав экстрактов // Журнал СФУ. Химия. 2011. Т. 4 (3). С. 248–256.
18. Salah A., Imene B., Abdigali B. Synthesis of betulin diformate and allobetulin formate directly from outer birch bark // Химия растительного сырья. 2019. №1. С. 113–117. https://doi.org/10.14258/jcprm.2019014682.
19. Arrous S., Boudebouz I., Parunov I., Plotnikov E., Voronova O. New Synthetic Method and Antioxidant Activity of Betulin Diformate and Allobetulin Formate // Chemistry of Natural Compounds. 2019. Vol. 55. Pp. 1094–1097. https://doi.org/10.1007/s10600-019-02902-5.
20. 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. https://doi.org/10.14258/jcprm.20230313179.
21. Gulliani G.L., Hyun B.H., Litten M.B. Blood recalcification time. A simple and reliable test to monitor heparin therapy // Am. J. Clin. Pathol. 1976. Vol. 65, no. 3. Pp. 390–396.
22. Dash B.C., Réthoré G., Monaghan M., Fitzgerald K., Gallagher W., Pandit A. The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility // Biomaterials. 2010. Vol. 31, no. 32. Pp. 8188–8197. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.067.

*Поступила в редакцию 20 мая 2025 г.*

*После переработки 1 июля 2025 г.*

*Принята к публикации 20 августа 2025 г.*

*Skurydina Ye.S.[1], Kuznetsova S.A.[1*], Drozd N.N.[2], Kuznetsov B.N.[3]* NEW METHODS OF PREPARATION OF ALLOBETULIN 3-O-FORMATE FROM BIRCH BARK AND STUDING ITS INFLUENCE ON BLOOD/PLAZMA COAGULATION

*[1] Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS, Akademgorodok, 50/24, Krasnoyarsk, 660036, Russia, kuznetssvetl@yandex.ru*
*[2] National Medical Research Center of Hematology, Novy Zykovsky Proezd, 4a, Moscow, 125167, Russia*
*[3] Federal Research Center KSC SB RAS, Akademgorodok, 50/24, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

The purpose of this work was to develop a new one-step method for the synthesis of allobetulin 3-O-formate from birch bark, select optimal synthesis conditions and to studing its influence on blood/plasma coagulation. A new one-step method has been proposed for the synthesis of allobetulin 3-O-formate from birch bark *Betula Pendula Roth.,* based on combining the extraction of betulin, its isomerization into allobetulin in the presence of a catalyst - orthophosphoric acid, and the esterification of allobetulin with formic acid. The influence of the duration of the process of treating birch bark with formic acid and the $H_3PO_4$ content on the yield of allobetulin 3-O-formate was established. The highest yield of crude allobetulin 3-O-formate (37% by weight of a.d.b.) is achieved at a process duration of 12 hours in the presence of 10% $H_3PO_4$, as well as with a duration of 16 hours in the presence of 8% $H_3PO_4$. The yield of recrystallized from ethanol allobetulin 3-O-formate is about 30% by weight of the a.d.b. The composition of the obtained samples of recrystallized allobetulin 3-O-formate was determined by elemental analysis, and its structure was confirmed by IR and NMR spectroscopy.

In vitro experiments conducted using human donor blood showed that allobetulin 3-O-formate exhibits pronounced procoagulant properties and does not have a significant effect on the erythrocyte membrane. Allobetulin 3-O-formate can be used to create biomaterials with specified properties in relation to blood coagulation.

*Keywords:* birch bark, betulin, allobetulin, 3-O-formate allobetulin, formic acid, blood/plasma coagulation.

**For citing:** Skurydina Ye.S., Kuznetsova S.A., Drozd N.N., Kuznetsov B.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2025, no. 4, OnLine First. (in Russ.). https://doi.org/10.14258/jcprm.20250417353.

***References***

1. Räsänen R.M., Hieta J.P., Immanen J., Nieminen K., Haavikko R., Yli-Kauhaluoma J., Kauppila T.J. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2019, vol. 411, pp. 7573–7583. https://doi.org/10.1007/s00216-019-02171-9.
2. Hemingway R.W. *Organic chemicals from biomass*. CRC Press, 2018, pp. 189–248.
3. Kuznetsov B.N., Levdanskiy V.A., Kuznetsova S.A. *Khimicheskiye produkty iz drevesnoy kory. Monografiya*. [Chemical products from tree bark. Monograph]. Krasnoyarsk, 2012, 260 p. (in Russ.).

* Corresponding author.

4. Takibayeva A.T., Zhumabayeva G.K., Bakibaev A.A., Demets O.V., Lyapunova M.V., Mamaeva E.A., Yerkassov R.Sh., Kassenov R.Z., Ibrayev M.K. *Molecules*, 2023, vol. 28, no. 16, 5946. https://doi.org/10.3390/molecules28165946.
5. Kuznetsova S.A., Skvortsova G.P., Maliar I.N., Skurydina E.S., Veselova O.F. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2014, vol. 40, pp. 742–747. https://doi.org/10.1134/S1068162014070073.
6. Adepoju F.O., Duru K.C., Li E., Kovaleva E.G., Tsurkan M.V. *Biomolecules*, 2023, vol. 13, no. 7, 1105. https://doi.org/10.3390/biom13071105.
7. Ren L., Niu S., Sun Y., Liang Y., Zhao J., Zhang T., Zhang J. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, vol. 157, 112539. https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112539.
8. Madej M., Gola J., Chrobak E. *Pharmaceutics*, 2023, vol. 15, no. 12, 2768. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122768.
9. Bębenek E., Chrobak E., Piechowska A., Głuszek S., Boryczka S. *Medical Studies/Studia Medyczne*, 2020, vol. 36, no. 4, pp. 298–302. https://doi.org/10.5114/ms.2020.102324.
10. 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. https://doi.org/10.14258/jcprm.2019045419. (in Russ.).
11. Amiri S., Dastghaib S., Ahmadi M., Mehrbod P., Khadem F., Behrooj H., Aghanoori M.-R., Machaj F., Ghamsari M., Rosik J., Hudecki A., Askami A., Hasemi M., Los M.J., Makkaram P, Madrakian T., Ghavami S. *Biotechnology advances*, 2020, vol. 38, 107409. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.008.
12. Drąg-Zalesińska M., Borska S. *World Scientific News*, 2019, vol. 127, no. 3, pp. 123–138.
13. Chrobak E., Świtalska M., Wietrzyk J., Bębenek E. *Applied Sciences*, 2024, vol. 14(21), 9970. https://doi.org/10.3390/app14219970.
14. Pinzaru I., Trandafirescu C., Szabadai Z., Mioc M., Ledeti I., Coricovac D., Ciurlea S., Ghiulai R.M., Crainiceanu Z., Simu G. *Rev. Chim*., 2014, vol. 65, pp. 848–851.
15. Pęcak P., Orzechowska B., Chrobak E., Boryczka S. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, vol. 225, 113738. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113738.
16. Kuznetsova S.A., Kuznetsov B.N., Skvortsova G.P., Skurydina Ye.S., Kalacheva G.S. *Zhurnal SFU. Khimiya*, 2010, vol. 3 (2), pp. 174–182. (in Russ.).
17. Kuznetsova S.A., Skvortsova G.P., Skurydina Ye.S., Malyar Yu.N., Khanchich O.A. *Zhurnal SFU. Khimiya*, 2011, vol. 4 (3), pp. 248–256. (in Russ.).
18. Salah A., Imene B., Abdigali B. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2019, no. 1, pp. 113–117. https://doi.org/10.14258/jcprm.2019014682.
19. Arrous S., Boudebouz I., Parunov I., Plotnikov E., Voronova O. *Chemistry of Natural Compounds*, 2019, vol. 55, pp. 1094–1097. https://doi.org/10.1007/s10600-019-02902-5.
20. 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. https://doi.org/10.14258/jcprm.20230313179. (in Russ.).
21. Gulliani G.L., Hyun B.H., Litten M.B. *Am. J. Clin. Pathol*., 1976, vol. 65, no. 3, pp. 390–396.
22. Dash B.C., Réthoré G., Monaghan M., Fitzgerald K., Gallagher W., Pandit A. *Biomaterials*, 2010, vol. 31, no. 32, pp. 8188–8197. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.067.

*Received May 20, 2025*

*Revised July 1, 2025*

*Accepted August 20, 2025*

**Сведения об авторах**

*Скурыдина Евгения Сергеевна* – ведущий инженер, zenav@mail.ru

*Кузнецова Светлана Алексеевна* – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, kuznetssvetl@yandex.ru

*Дрозд Наталья Николаевна* – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, nndrozd@mail.ru

*Кузнецов Борис Николаевич* – доктор химических наук, профессор, руководитель научного направления, bnk@icct.ru

**Information about authors**

*Skurydina Evgeniya Sergeevna* – Lead Engineer, zenav@mail.ru

*Kuznetsova Svetlana Alekseevna* – Doctor of Chemical Sciences, Leading Researcher, kuznetssvetl@yandex.ru

*Drozd Natalya Nikolaevna* – Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, nndrozd@mail.ru

*Kuznetsov Boris Nikolaevich* – Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of Research, bnk@icct.ru