

Р.З. Касенов¹, О.В. Демец¹, Г.Т. Картбаева², С.С. Жумадилов²,
А.А. Бакибаев³, Р.Р. Ахмеджанов⁴

¹Карагандинский государственный технический университет, Казахстан;

²Карагандинский государственный университет им. Е.А. Букетова, Казахстан;

³Томский государственный университет, Россия;

⁴Томский государственный педагогический университет, Россия
(E-mail: sweetc7@mail.ru)

Исследование количественного выхода бетулина из березы киргизской и синтез его фосфорилированного производного

В статье изучена зависимость количественного выхода бетулина из березы киргизской от продолжительности экстракции и концентрации водного раствора щелочи; синтез на основе выделенного бетулина нового фосфорилированного производного; определение с помощью компьютерного прогнозирования биологической активности полученного соединения. Для того, чтобы проследить зависимость выхода бетулина от времени и концентрации раствора щелочи, был проведен ряд опытов. Для этого бересту измельчали и сушили до постоянного веса. Для экспериментов брали одинаковое количество бересты, используя для экстракции бутиловый спирт и щелочь различной концентрации. Для разной серии опытов продолжительность экстракции составляла 2, 3 и 4 ч соответственно. Были получены экспериментальные данные о выходе бетулина в зависимости от времени и концентрации раствора щелочи. Температура плавления выделенного вещества составляла 243 °С. Бетулин идентифицировали с помощью тонкослойной хроматографии и сравнивали со стандартным образцом. Вещество анализировали методами инфракрасной спектроскопии в таблетках КВг и высокоэффективной жидкостной хроматографии. В Фурье-спектрометре ФСМ-1201 с помощью характеристических частот полос поглощения было определено наличие в молекуле различных групп атомов и связей, характерных для бетулина. Хроматографическое исследование образца проводилось с помощью газового хроматографа Agilent 7890А с масс-селективным детектором 5975 inert XL. Проведена реакция фосфорилирования бетулина. Проведен физико-химический анализ синтезированного соединения. С помощью компьютерной программы PASS проведено компьютерное прогнозирование его биологической активности.

Ключевые слова: береза киргизская, береста, экстракция, бетулин, бутиловый спирт, щелочь, ИК-спектроскопия, газовый хроматограф, тонкослойная хроматография, фосфорилирование, компьютерное биопрогнозирование.

Введение

Изучив научную литературу, посвященную выделению бетулина из различных видов берез, таких как *Betula pubescenz*, *Betula pendula*, *Betula alba* и другие, авторы пришли к следующему выводу, что работы по изучению химического состава березы киргизской (*Betula kirghisorum*), эндемичного растения флоры Казахстана, не проводились. В данной работе мы преследовали следующие цели: 1) исследовать зависимость количественного выхода бетулина из березы киргизской от продолжительности экстракции и концентрации водного раствора щелочи; 2) получить на основе выделенного бетулина новые фосфорсодержащие производные; 3) определить с помощью компьютерного прогнозирования биологическую активность полученных соединений.

Новые результаты, полученные в настоящем исследовании, представляют собой несомненный научный и практический интерес.

Береза киргизская произрастает на сравнительно небольшой территории Республики Казахстан. По литературным данным, она встречается на территории Наурзумского государственного природного заповедника и Каркаралинского государственного национального природного парка [1, 2]. Она является эндемичным растением.

Ранее нами был получен из березы киргизской бетулин, который был идентифицирован с помощью ИК-спектроскопии и по данным ВЭЖХ.

В последнее время наблюдается неуклонно растущий интерес к бетулину и его производным, обусловленный широким спектром биологической активности этих соединений [3, 4]. Доказано, что бетулин и ряд его производных обладают антиоксидантными, противовоспалительными, антисептическими, гепатопротекторными свойствами [5, 6], также производные бетулина проявляют анти-ВИЧ

активность [7, 8]. На основе бетулина синтезированы перспективные фармацевтические препараты с противоопухолевой и антивирусной активностью.

Экспериментальная часть и обсуждение результатов

Экстракцию *Betula kirghisorum* проводили по известной методике [9]. В исследовании использовали внешнюю часть коры березы (бересту). Бересту измельчали до частиц размером 5–8 мм, сушили при 100 °С до постоянного веса. Далее проводили 3 серии экспериментов.

Первая серия: в четыре одинаковые колбы объемом 500 мл помещали по 10 г высушенной, измельченной бересты, затем в первую колбу прилили 15 %-ный раствор гидроксида натрия и 250 мл бутанола, во вторую колбу 20 %-ный раствор гидроксида натрия и 250 мл бутанола, в третью — 25 %-ный раствор гидроксида натрия и 250 мл бутанола, в четвертую — 30 %-ный раствор гидроксида натрия и 250 мл бутанола. Каждую колбу снабдили обратным холодильником и мешалкой, кипятили в течение 2 ч. Затем, после прекращения кипения, реакционная масса расслаивалась на два слоя: верхний слой — раствор бетулина в бутаноле, нижний слой представлял собой темно-коричневую вязкую массу гидрогенизированной бересты. Далее, отделив верхнюю часть, ее упаривали досуха на роторном испарителе. К остатку приливали воду. Затем отфильтровывали, остаток на фильтре промывали дистиллированной водой до нейтральной среды и высушивали.

Вторая серия экспериментов была проведена аналогично, однако время экстракции увеличили до 3 ч. В третьей серии экспериментов время экстракции составляло 4 ч.

Выход бетулина, выделенного из бересты, гидролизованной в водном растворе гидроксида натрия, в зависимости от концентрации щелочи и продолжительности гидролиза в присутствии бутанола, приведен в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Данные о выходе бетулина, экстрагируемого бутанолом из бересты березы киргизской, гидролизованной в присутствии гидроксида натрия

Концентрация NaOH, %	Длительность гидролиза бересты бутанолом, ч		
	2	3	4
Выход бетулина при экстракции бутанолом, % от аб.с.б.			
15	2,9	4,9	2,5
20	6,5	10,9	5,9
25	5,9	7,6	5,5
30	3,9	5,2	2,7

Как видно из данных таблицы 1, максимальный выход бетулина наблюдается при гидролизе бересты в 20 %-ном растворе щелочи в течение 3 ч.

Все образцы бетулина, извлекаемые бутанолом из бересты, гидролизованной в присутствии гидроксида натрия после перекристаллизации из этанола, представляют собой порошки белого цвета с температурой плавления 243 °С.

Полученные вещества идентифицировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах Silufol с использованием элюирующих систем: бензол : хлористый метилен : этиловый спирт = 5:5:1. Детектирование пятен осуществляли 10%-ным раствором фосфорномолибденовой кислоты с последующим нагреванием пластины в течение 3–4 мин. Вещества сравнивали с образцом бетулина, предоставленного сотрудниками лаборатории органического синтеза Томского государственного университета. Хроматограмма показала, что образец и исследуемое вещество идентичны. Далее полученное нами вещество анализировали с помощью ИК-спектрокопии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Регистрацию ИК-спектров проводили на Фурье-спектрометре марки ФСМ–1201, в диапазоне длин волн 500–4000 см⁻¹ в таблетках бромида калия (рис. 1).

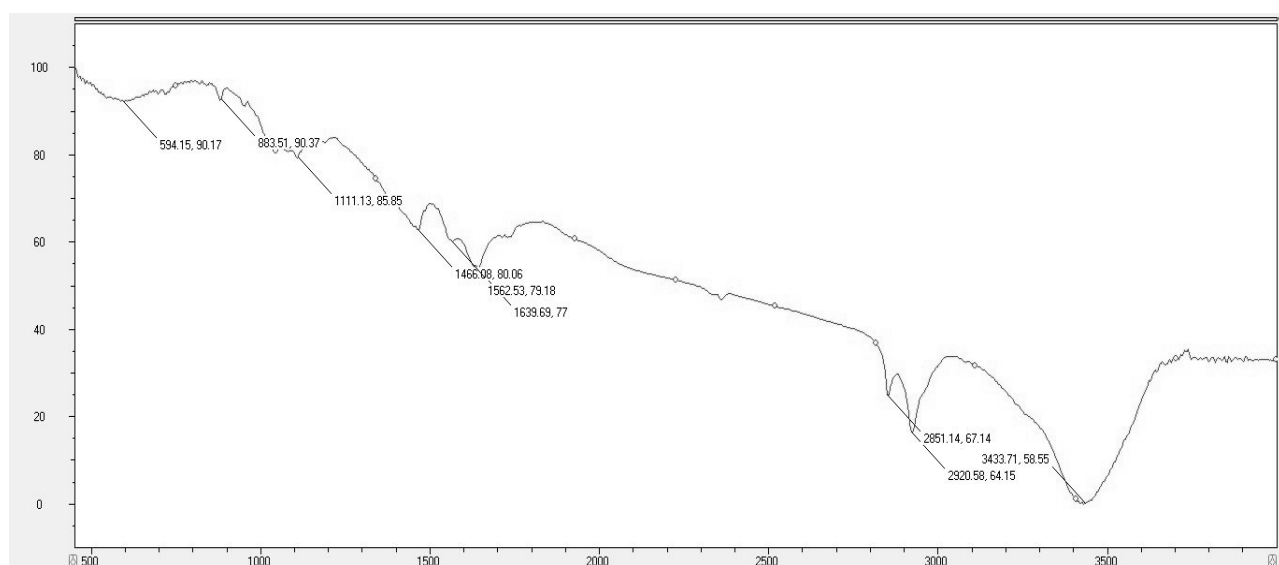
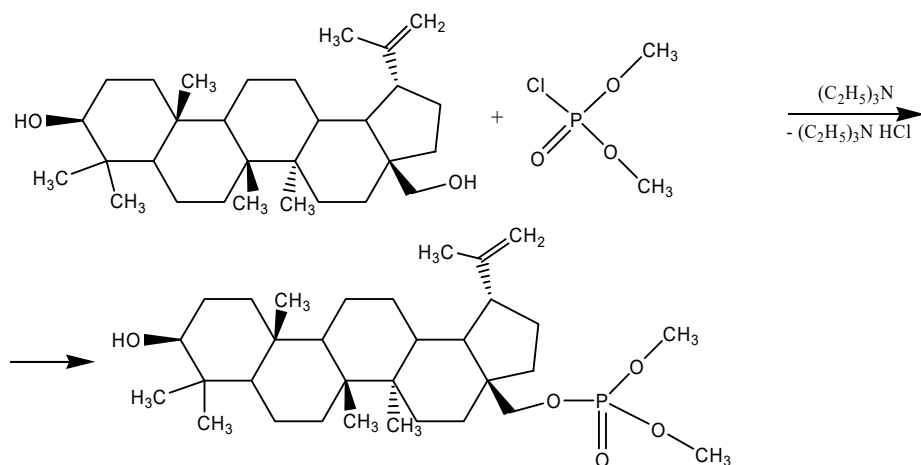


Рисунок 1. ИК-спектр образца бетулина

С помощью характеристических частот полос поглощения было определено наличие в молекуле различных групп атомов и связей, характерных для молекулы бетулина (рис. 1). Были идентифицированы полосы поглощения, характерные для следующих групп атомов: имеется широкая полоса поглощения, принадлежащая валентным колебаниям гидроксильных групп, при 3433 см^{-1} ; валентные колебания, характерные для C–H групп лупанового скелета, при 2920 и 2851 см^{-1} ; валентные колебания двойной связи C=C при 1639 см^{-1} ; деформационные колебания CH_2 групп наблюдаются при 1466 см^{-1} ; валентные колебания C–O группы наблюдаются при 1111 см^{-1} ; деформационные колебания CH_3 групп — при 883 см^{-1} . Сравнение ИК-спектра полученных образцов с ИК-спектрами, приведенными в различных источниках, позволяет сделать заключение, что полученные нами образцы — бетулин.

Следующая часть работы посвящена разработке методов синтеза на основе природного тритерпеноида бетулина новых биологически активных фосфорсодержащих производных. Преимуществами фосфорсодержащих производных бетулина являются высокая растворимость в воде, высокая биодоступность и благоприятная биотрансформация в организме человека и животных [10].

Синтез фосфорилированных производных бетулина проводили по следующей методике: в двухгорлую колбу, снабженную мешалкой и обратным холодильником, поместили $0,8 \text{ г}$ ($0,01 \text{ М}$) бетулина, $1,6 \text{ г}$ ($0,01 \text{ М}$) триэтиламина и при нагревании растворили в 40 мл бензола. В эту смесь добавили $0,6 \text{ мл}$ ($0,01 \text{ М}$) диметилхлорфосфата. Реакцию проводили при температуре $75 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 6 ч при непрерывном перемешивании. После упаривания растворителя выпал осадок белого цвета. Присоединение фосфорсодержащего фрагмента к молекуле бетулина происходит по следующей схеме:



Ход реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии. Полученное вещество анализировали методами ИК-спектроскопии (рис. 2). По данным ИК-спектроскопии, наряду с полосами поглощения, характерных для бетулинового фрагмента, были идентифицированы полосы поглощения, характерные для групп Р–О–СН₃ при 1195 см⁻¹ и Р=О при 1280 см⁻¹.

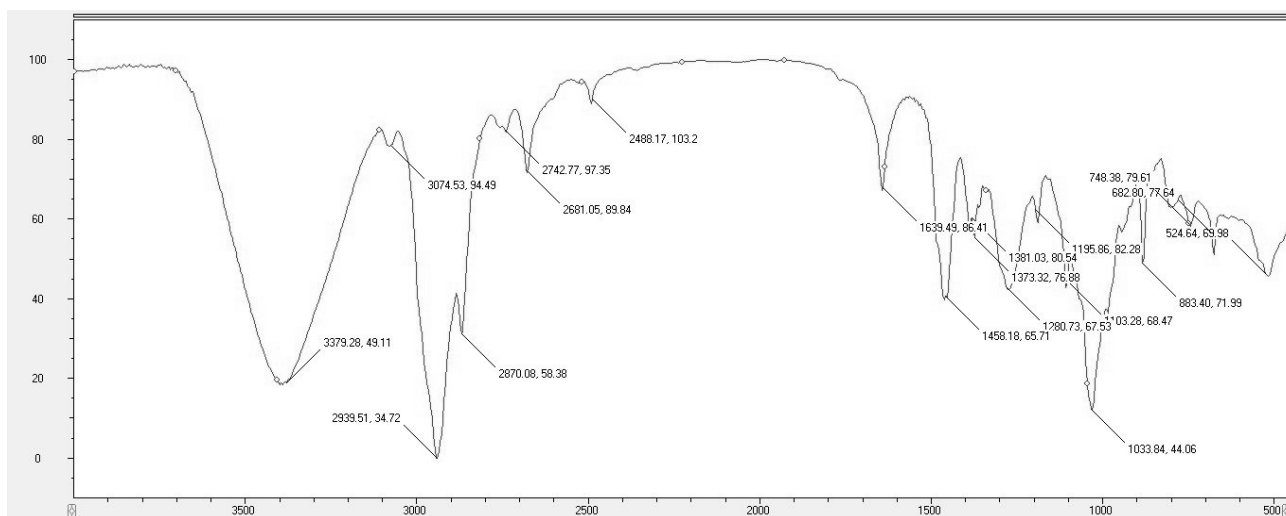


Рисунок 2. ИК-спектр фосфорилированного производного бетулина

Для хроматографического исследования продукта использовался газовый хроматограф Agilent 7890А с масс-селективным детектором 5975 inert XL. По данным хроматографического анализа также выявлено наличие фосфорного фрагмента в полученном веществе (рис. 3).

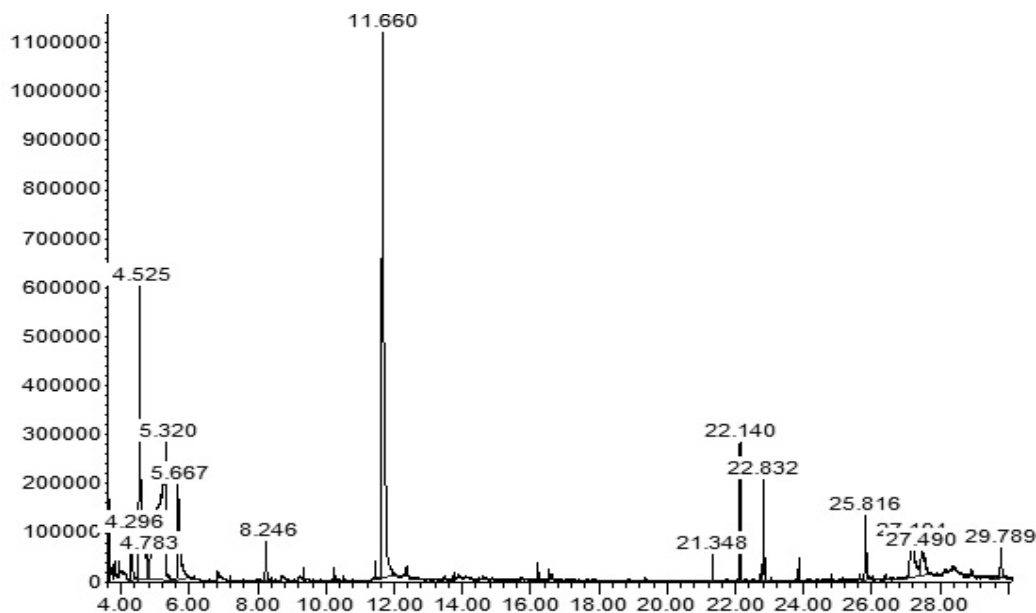


Рисунок 3. Хромато-масс-спектр фосфорилированного производного бетулина

Таким образом, по данным ИК- и хромато-масс-спектроскопии установлено, что реакция присоединения фосфатных групп к молекуле бетулина происходит в положении С-28.

Синтезированное фосфорилированное производное бетулина проанализировали с помощью компьютерной программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) — прогноз спектров биологической активности органических соединений, основанной на анализе взаимосвязей «структура – активность» с использованием обучающей выборки, содержащей большое количество разнородных химических соединений с различными видами биологической активности (табл. 2). Использование PASS

позволяет уже на ранних стадиях исследования отобрать из возможных веществ те, которые могут обладать желательными видами биологической активности [11].

Т а б л и ц а 2

Прогноз спектров биологической активности фосфорилированного производного бетулина

P_a	P_i	Активность
0,92	0,001	Транскрипционный фактор NF-κB
0,92	0,001	Стимулятор транскрипционного фактора
0,89	0,005	Противоопухолевая
0,85	0,004	Антипротозойная (лейшмания)
0,83	0,004	Каспаза 3 стимулятор
0,82	0,004	Гепатопротекторная
0,79	0,002	Каспаза 8 стимулятор
0,78	0,004	Противоопухолевые препараты (меланома)
0,77	0,035	Ингибитор CDP-глицерол-глицерофосфотрансферазы
0,73	0,005	Противоопухолевые препараты (рак легких)
0,73	0,013	Иммунодепрессант
0,73	0,012	Агонист апоптоза
0,72	0,009	Ингибитор фосфатазы
0,68	0,005	Противоопухолевый (колоректальный рак)
0,70	0,027	Маннотетраозный ингибитор 2-альфа-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы
0,67	0,006	Противоопухолевый (рак толстой кишки)
0,66	0,006	Ингибитор экспрессии AR
0,65	0,005	Лечение заболеваний печени
0,64	0,004	Противоопухолевая (рак яичников)
0,63	0,009	Ингибитор бета-глюкуронидазы
0,68	0,052	Противоэземная

Таким образом, судя по компьютерному прогнозированию, от синтезированного нами фосфорилированного производного бетулина с большей долей вероятности можно ожидать следующие виды активности: 1) транскрипционный фактор NF-κB (ядерный фактор «каппа-би» — универсальный фактор транскрипции, контролирующей экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Нарушение регуляции NF-κB вызывает воспаление, артроз, артрит, а также развитие вирусных инфекций и рака; 2) антипротозойную активность; 3) гепатопротекторную активность и т.д.

Выводы

Впервые проведено исследование зависимости количественного выхода бетулина из березы киргизской от продолжительности экстракции и концентрации водного раствора щелочи. Выделение бетулина осуществлялось методом экстракции из бутилового спирта, гидролизованного в водном растворе щелочи. Бетулин идентифицировали методом ТСХ на пластинах Silufol и анализировали с использованием методов ИК-спектрокопии, газовой хроматографии. В качестве стандарта использовался образец, предоставленный учеными Томского государственного университета РФ. С помощью характеристических частот поглощения в ИК-спектре было определено наличие в соединении различных групп атомов и связей, характерных для молекулы бетулина.

Впервые синтезировано фосфорилированное производное бетулина, а также установлено, что реакция присоединения фосфатной группы к молекуле бетулина происходит в положении С –28.

С помощью компьютерной программы PASS проведено компьютерное прогнозирование биологической активности синтезированного производного бетулина.

Список литературы

1 Сайт Каркаралинского государственного национального природного парка. [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://karkaralinsk-park.ru>

- 2 Сайт Наурзумского государственного заповедника. [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.old.unesco.kz>
- 3 Кислицын А.Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение / А.Н. Кислицын // Химия древесины. — 1994. — № 3. — С. 3–28.
- 4 Толстиков Г.А. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность / Г.А. Толстиков, О.Б. Флехтер, Э.Э. Шульц и др. // Химия в интересах устойчивого развития. — 2005. — № 13. — С. 1–13.
- 5 Matsuda H. Hepatoprotective, superoxide scavenging and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica* / H. Matsuda, A. Ishikado, N. Nishida // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter. — 1998. — Vol. 8. — P. 2939–2944.
- 6 Urban M. Synthesis of A-Seco Derivatives of Betulinic Acid with Cytotoxic Activity / M. Urban // Journal of Natural Products. — 2004. — Vol. 67. — P. 1100–1105.
- 7 Кузнецова С.А. Изучение состава этанольного экстракта березы и его токсико-фармакологических свойств / С.А. Кузнецова, Г.П. Скворцова, Г.С. Калачева, И.А. Зайбель, О.В. Ханчич // Химия растительного сырья. — 2010. — № 1. — С. 137–141.
- 8 Evers M. Betulinic acid derivatives: A new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action / M. Evers, C.F. Poujade, Soler et al. // J. Med. Chem. — 1996. — Vol. 39. — P. 1056–1068.
- 9 Левданский В.А. Экстракция бетулина алифатическими спиртами С3–С4 из бересты березы, гидролизованной в водном растворе щелочи / В.А. Левданский, А.В. Левданский // Химия растительного сырья. — 2014. — № 1. — С. 131–137.
- 10 Толстиков И.Г. Терпеноиды ряда лупана — биологическая активность и фармакологические перспективы / И.Г. Толстиков, И.В. Сорокина, Г.А. Толстиков и др. // Биоорганическая химия. — 2006. — № 1. — С. 42–55.
- 11 Филимонов Д.А. Прогноз спектра биологической активности органических соединений / Д.А. Филимонов, В.В. Поройков // Журн. Рос. хим. общ-ва им. Д.И. Менделеева. — 2006. — № 2.

Р.З. Касенов, О.В. Демец, Г.Т. Картбаева, С.С. Жумадилов,
А.А. Бакибаев, Р.Р. Ахмеджанов

Кыргыз кайыңының қабығынан бетулиннің сандық шығымын зерттеу және оның фосфорлы туындысын алу

Мақалада қыргыз кайыңынан бетулиннің сандық шығымының экстракция ұзақтығына және сілтінің сулы ерітіндісінің концентрациясына тәуелділігі; алынған бетулиннің негізінде жаңа фосфорланған туынды алу; алынған қосылыстың биологиялық белсенділігін компьютерлік болжау арқылы анықтау зерттелді. Бетулин шығымының уақытқа және сілті ерітіндісінің концентрациясына тәуелділігін бақылау үшін тәжірибелер қатары жүргізілді. Ол үшін қабық үгітіліп, тұрақты температураға дейін кептірілді. Экстракцияға қажет бутил спиртінің және сілтінің әртүрлі концентрацияларын пайдаланып, тәжірибелер үшін қабықтың бірдей мөлшерлері алынды. Тәжірибелердің әр қатары үшін экстракция ұзақтығы 2, 3 және 4 сағ құрады. Бетулиннің шығымының уақытқа және сілтінің концентрацияларына тәуелділігі туралы мәліметтер алынды. Бөлінген заттың қайнау температурасы 243 °С құрады. Бетулин жұқақабатты хроматография әдісімен анықталды және стандартты үлгімен салыстырылды. Зат КВг таблеткасында инфрақызыл спектроскопия және газды хроматография әдістерімен талданды. ФСМ-1201 Фурье спектрометрінде жұтылу жолақтарының сипаттамалық жиіліктерінің көмегімен молекулада бетулинге тән атомдардың әртүрлі топтарының және байланыстырдың бар екендігі анықталды. Үлгіні хроматографиялық талдау 5975 inert XL масс-селективті детекторлы Agilent 7890A газды хроматографының көмегімен жүргізілді. Бетулинді фосфорлау реакциясы жүргізілді. Алынған қосылысқа физика-химиялық талдау жасалды. PASS компьютерлік бағдарламасының көмегімен оның биологиялық белсенділігіне компьютерлік болжау өткізілді.

Кілт сөздер: қыргыз кайыңы, қабық, экстракция, бетулин, бутил спирті, сілті, ИҚ-спектроскопия, газды хроматография, жұқақабатты хроматография, фосфорлау, компьютерлік болжау.

R.Z. Kasenov, O.V. Demets, G.T. Kartbaeva, S.S. Zhumadilov,
A.A. Bakibayev, R.R. Akhmedzhanov

Study of the quantitative yield of betulin from the Kyrgyz birch and synthesis of its phosphorylated derivative

In the article the dependence of the quantitative yield of betulin from Kyrgyz birch on the duration of extraction and the concentration of an aqueous solution of alkali; synthesis based on isolated betulin new phosphorylated derivative; determination using computer prediction of the biological activity of the obtained compound are examined. In order to trace the dependence of the betulin yield on the time and concentration of the alkali solution, a series of experiments were carried out. To do this, the bark was crushed and dried to constant weight.

For the experiments, we took the same amount of birch bark, using for extraction butyl alcohol and alkali for varying concentrations. For a different series of experiments, the duration of extraction was 2, 3, and 4 hours. Experimental data were obtained on the yield of betulin, depending on the time and concentration of the alkali solution. The melting point of the isolated substance was 243 °C. Betulin was identified by thin layer chromatography and compared with a standard sample. The substance was analyzed by infrared spectroscopy methods in KBr tablets and high-performance liquid chromatography. In the Fourier spectrometer FSM-1201, the characteristic frequencies of absorption bands were used to determine the presence of various groups of atoms and bonds characteristic of betulin in a molecule. Chromatographic study of the sample was carried out using an Agilent 7890A gas chromatograph with a mass selective detector 5975 inert XL. The reaction of phosphorylation of betulin was carried out. The physicochemical analysis of the synthesized compound was carried out. Using the PASS computer program, computer prediction of its biological activity was performed.

Keywords: Kyrgyz birch, birch bark, extraction, betulin, butyl alcohol, alkali, IR spectroscopy, gas chromatography, thin-layer chromatography, phosphorylation, computer bio-programming.

References

- 1 Sait Karkaralinskoho hosudarstvennogo natsionalnogo prirodnogo parka [Site of Karkaraly State National Natural Park]. *karkaralinsk-park.ru*. Retrieved from: <https://karkaralinsk-park.ru> [in Russian].
- 2 Sait Naurzumskoho hosudarstvennogo zapovednika [Site of Naurzum State Reserve]. *old.unesco.kz*. Retrieved from: <https://www.old.unesco.kz> [in Russian].
- 3 Kislitsyn, A.N. (1994). Ekstraktivnye veshchestva beresty: vydelenie, sostav, svoistva, primeneniye [Birch bark extractives: isolation, composition, properties, application]. *Khimiia drevesiny — Wood Chemistry*, 3, 3–28 [in Russian].
- 4 Tolstikov, G.A., Flekhter, O.B., & Shults, E.E. (2005). Betulin i eho proizvodnye. Khimiia i biolohicheskaia aktivnost [Betulin and its derivatives. Chemistry and Biological Activity]. *Khimiia v interesakh ustoichivogo razvitiia — Chemistry for sustainable development*, 13, 1–13 [in Russian].
- 5 Matsuda, H., Ishikado, A., & Nishida, N. (1998). Hepatoprotective, superoxide scavenging and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*, 8, 2939–2944.
- 6 Urban, M. (2004). Synthesis of A-Seco Derivatives of Betulinic Acid with Cytotoxic Activity. *Journal of Natural Products*, 67, 1100–1105.
- 7 Kuznetsova, S.A., Skvortsova, G.P., Kalacheva, G.S., Zaibel, I.A., & Khanchich, O.V. (2010). Izuchenie sostava etanolnoho ekstrakta berezy i eho toksiko-farmakolohicheskikh svoistv [The study of the composition of ethanol extract of birch and its toxic-pharmacological properties]. *Khimiia rastitelnoho syria — Chemistry of plant materials*, 1, 137–141 [in Russian].
- 8 Evers, M., Poujade, C.F. & Soler, F. (1996). Betulinic Acid Derivatives: A new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action. *J. Med. Chem*, 39, 1056–1068.
- 9 Levanskii, V.A., & Levanskii, A.V. (2014). Ekstraksiia betulina alifaticeskimi spirtami C3–C4 iz beresty berezy, hidrolizovannoi v vodnom rastvore shchelochi [Extraction of betulin aliphatic alcohols C3–C4 from birch bark, hydrolyzed in an aqueous solution of alkali]. *Khimiia rastitelnoho syria — Chemistry of plant materials*, 1, 131–137 [in Russian].
- 10 Tolstikov, I.G., Sorokina, I.V., & Tolstikov, G.A. (2006). Terpenoidy riada lupana — biolohicheskaia aktivnost i farmakolohicheskie perspektivy [Terpenoids of the Lupan series — biological activity and pharmacological perspectives]. *Bioorganicheskaiia khimiia — Bioorganic chemistry*, 1, 42–55 [in Russian].
- 11 Filimonov, D.A., & Poroikov, V.V. (2006). Prohnoz spektra biolohicheskoi aktivnosti orhanicheskikh soedinenii [Prediction of the spectrum of biological activity of organic compounds]. *Zhurnal Rossiiskogo khimicheskogo obshchestva imeni D.I. Mendeleeva — Journal of the Russian Chemical Society named after D.I. Mendeleev*, 2 [in Russian].