

С.С. Калиева¹, Е.А. Мамаева², Е.Е. Нурпейис^{2, 3}, А.А. Бакибаев³,
А.К. Ташенов¹, М.К. Заманова⁴, Т.С. Кең⁵

¹Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан;

²Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Россия;

³Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия;

⁴Академия Синика, Институт химии, Национальный университет Чжао Тунг, Тайбэй, Тайвань;

⁵Муниципальное автономное общеобразовательное учреждение «Гимназия № 18», Томск, Россия
(E-mail: miledi_2212@mail.ru)

Способы очистки некоторых пентациклических тритерпеноидов

В статье рассмотрены способы очистки наиболее важных представителей лупанового и олеанового рядов (бетулина, диацетата бетулина и аллобетулина) с использованием методов перекристаллизации и колоночной хроматографии, а также проведено сравнение методов и сделано заключение о наиболее эффективных и предпочтительных способах. Было отмечено, что очистка технических субстанций пентациклических тритерпеноидов методом перекристаллизации является неэффективной, поскольку содержание основных компонентов в образцах с использованием данного метода увеличивается всего на 2 %, а также наблюдаются существенные потери при очистке. Установлено, что наилучший результат достигается при очистке указанных субстанций методом колоночной хроматографии с использованием оксида алюминия в качестве сорбента. В этом случае, согласно данным хромато-масс-спектрометрического анализа, зафиксировано повышение содержания основного вещества в пробе на 4–7 %. Показано, что данный способ является удобным для очистки бетулина, диацетата бетулина и аллобетулина от сопутствующих примесей и позволяет получать их чистые субстанции, пригодные для дальнейшего использования в органическом синтезе, электрохимических, микробиологических, спектральных и других методах исследования. Достоинствами предложенного хроматографического способа очистки тритерпеноидов являются простота исполнения, экспрессность и высокая чистота полученных образцов. Для сравнения эффективности проведенных методов очистки субстанций были использованы современные физико-химические методы анализа. На основе имеющихся результатов предложенный авторами хроматографический метод очистки как наиболее эффективный может быть применен для получения чистых субстанций других представителей пентациклических тритерпеноидов лупанового и олеанового рядов.

Ключевые слова: пентациклические тритерпеноиды, бетулин, диацетат бетулина, аллобетулин, перекристаллизация, колоночная хроматография.

Кора березы богата разнообразными экстрактивными веществами. В экстрактах внешней коры белой березы *Betula pendula* L. преобладает природный пентациклический тритерпеноид лупанового ряда — 3 β ,28-дигидрокси-20(29)-лупен — бетулин, содержание которого может достигать 40 % и зависит от условий произрастания, времени года и других факторов [1–4]. Для бетулина установлена противовоспалительная [5], противовирусная (наблюдается синергетический эффект с ацикловиром) [6] и противоопухолевая активность [7].

Также изучены производные бетулина, такие как диацетат бетулина и аллобетулин, которые проявляют выраженное биологическое действие. Диацетат бетулина (3 β ,28-диацетокси-луп-20(29)-ен) известен своей желчегонной и гиполипидемической активностью [2, 8]. Аллобетулин (3 β -гидрокси-19 β ,28-эпокси-18 α -олеан) и его производные проявляют разнообразную биологическую активность: противоязвенную, противовирусную, антифидантную [9–12].

В настоящее время природные пентациклические тритерпеноиды (ПТ) и их синтетические модификаты, обладающие целым набором биологически полезных и уникальных свойств, находятся под пристальным вниманием исследователей и представляют исключительный интерес для фармацевтической, косметической и пищевой промышленности. В связи с этим существует большая потребность в получении чистых субстанций этих веществ.

Несмотря на многочисленные исследования химических модификаций ПТ, получение их производных является достаточно сложным процессом, характеризующимся низкой селективностью и, как следствие, низким выходом целевых продуктов. Недостаточная чистота выделенных из экстрактов или реакционной массы субстанций, содержащих целевые вещества, является серьезным препятствием для вольтамперометрических (ВА) исследований, определения антиоксидантной активности (АОА), а также дальнейших химических модификаций ПТ. Очевидно, что подобные исследования

диктуют потребность в простых способах очистки их от примесей. Поэтому одной из актуальных задач является разработка простых и эффективных способов очистки субстанций, содержащих ПТ.

В настоящее время литературные сведения о способах очистки ПТ от примесей представлены, как правило, методами перекристаллизации бетулина и его производных из разных растворителей (таких как низшие алифатические спирты, хлороформ, ацетон, этилацетат, дихлорметан и др.), однако это сопряжено с образованием сольватных комплексов с тритерпеноидами, что затрудняет их идентификацию как индивидуальных соединений [13]. Кроме того, при использовании этанола в качестве растворителя для перекристаллизации наблюдаются существенные потери (до 40 %) целевых веществ [14].

В связи с этим целью данной работы являются поиск и разработка сравнительно простого и эффективного метода, обеспечивающего получение субстанций пентациклических тритерпеноидов высокой степени чистоты, которые могут быть в дальнейшем использованы как в органическом синтезе, так и в электрохимических (ВА, АОА) и микробиологических исследованиях.

Экспериментальная часть

Бетулин — 3 β ,28-дигидрокси-20(29)-лупен или луп-20(29)-ен-3 β ,28-диол — выделяли из предварительно измельченной бересты *Betula pendula* по методу [15]. Неочищенные субстанции диацетата бетулина и аллобетулина получали по методам, описанным в работах [16, 17] соответственно.

Регистрацию ИК-спектров проводили на спектрометре фирмы Agilent Technologies, марка Cary 600 Series FTIR Spectrometr в таблетках бромида калия. Измерение проводили в диапазоне от 4000 до 400 см⁻¹.

Спектры ¹H ЯМР образцов регистрировали на приборе ЯМР Фурье-спектрометр Avance AV 300 Bruker в растворах CDCl₃.

Температуру плавления образцов определяли с помощью прибора для автоматического определения точки плавления Melting Point System MP50 Mettler Toledo.

Хромато-масс-спектрометрическое (ХМС) исследование проб проводили на газо-хроматографическом комплексе Agilent 7820 с масс-селективным квадрупольным детектором Agilent 5975 при температуре источника ионов 230 °С, температуре квадрупольного 150 °С, энергии ионизации 70 эВ и диапазоне сканирования масс m/z 46÷1050.

Контроль индивидуальности веществ проводили методом ТСХ на пластиках Sorbfil с использованием элюирующих систем: этилацетат : гексан = 1 : 1 (А), гексан : этилацетат = 4 : 1 (Б), хлороформ : этанол = 40 : 1 (В). Детектирование пятен осуществляли модифицированным реактивом Эрлиха (*n*-диметиламинобензальдегид : H₂SO₄ : CH₃COOH) с последующим нагреванием пластин в течение 2–3 мин (Г).

На первом этапе нашей работы для очистки сухих субстанций бетулина и диацетата бетулина применяли метод перекристаллизации как наиболее распространенный и относительно малотрудоемкий (способы 1а и 1б).

Способ 1а. Очистка бетулина перекристаллизацией из этанола

Сухой экстракт бетулина (рис. 1) массой 0,40 г (чистотой 94 %) растворяли в 40 мл этанола при нагревании и перемешивании, горячий раствор отфильтровывали, нерастворимый остаток отбрасывали, фильтрат охлаждали. Выпавший осадок фильтровали, сушили при температуре 80–90 °С, получили бежевые кристаллы с T_{пл} 250–253 °С ([15]: T_{пл} 257–258 °С). После перекристаллизации был получен образец сухого экстракта бетулина с содержанием 96 % основного вещества, что было подтверждено методом ХМС. Масса полученного образца бетулина 0,21 г, что составляет 53 % от массы первоначальной субстанции.

Способ 1б. Очистка диацетата бетулина перекристаллизацией из этанола с активированным углем

Высушенную субстанцию диацетата бетулина (ДАБ, рис. 2) массой 2,5 г (чистотой 89 %) растворяли в 50 мл этанола при нагревании и перемешивании, затем добавляли 2,5 г активированного угля, суспензию нагревали до кипения при перемешивании, горячий раствор отфильтровывали от угля и нерастворимых примесей, маточный этанольный раствор охлаждали. Выпавшие желтые кристаллы отделяли на воронке и сушили при температуре 60–70 °С. Масса полученного осадка составила 1,28 г (51 %), T_{пл} 208–214 °С ([16]: T_{пл} 222–223 °С), а содержание ДАБ в полученном образце составило 91 % (ХМС).

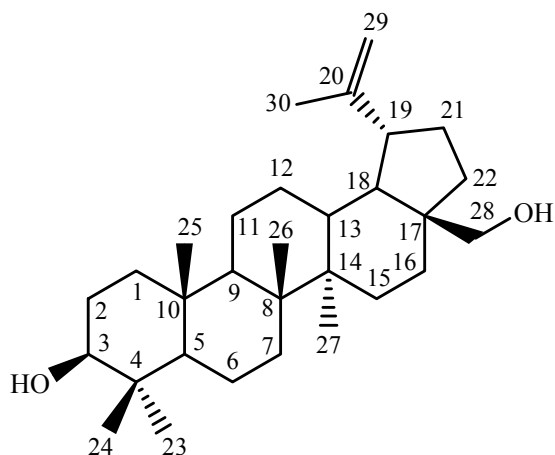


Рисунок 1. Структурная формула бетулина

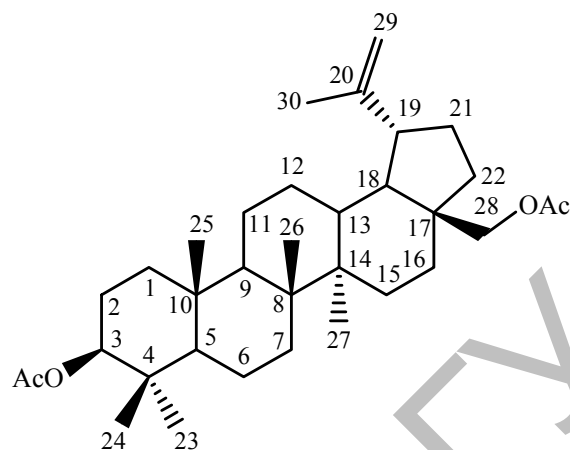


Рисунок 2. Структурная формула диацетата бетулина

Поскольку, согласно данным ХМС, содержание основных веществ в образцах бетулина и ДАБ увеличилось всего на 2 % (способы 1а и 1б), очистка методом перекристаллизации не была достаточно эффективной. Поэтому на втором этапе наших исследований мы проводили очистку неочищенных субстанций ПТ (бетулина, диацетата бетулина и аллобетулина) с использованием метода колоночной хроматографии как альтернативного традиционной перекристаллизации (способы 2а–в).

Способ 2а. Очистка бетулина методом колоночной хроматографии с Al_2O_3

Для очистки бетулина методом колоночной хроматографии в качестве сорбента использовали окись алюминия, в качестве подвижной фазы — ацетон. Через заполненную сорбентом хроматографическую колонку пропускали ацетон до полного набухания сорбента. Навеску неочищенного бетулина 3,5 г (чистотой 94 %) растворяли в 500 мл ацетона. Ацетоновый раствор бетулина переносили в хроматографическую колонку, затем вносили чистый ацетон. Собирали фракции, содержащие бетулин, с R_f 0,4 в системе А (ТСХ), детектирование пятен осуществляли модифицированным реактивом Эрлиха (Г). Из объединенных фракций отгоняли растворитель, остаток сушили. Получили белое кристаллическое вещество массой 2,1 г (60 %), $T_{пл}$ 258–260 °С ([15]: $T_{пл}$ 257–258 °С), с содержанием бетулина 98 %, согласно данным метода ХМС.

Способ 2б. Очистка ДАБ методом колоночной хроматографии с Al_2O_3

Метод аналогичен методу очистки бетулина (способ 2а). Масса неочищенного диацетата бетулина составляла 0,5 г (чистота 89 %), навеску растворяли в 30 мл ацетона. Показатель R_f для фракций, содержащих ДАБ, 0,66 в системе Б (ТСХ), проявление пятен осуществляли модифицированным реактивом Эрлиха (Г). Из объединенных фракций отгоняли растворитель, остаток сушили. Масса полученного осадка 0,29 г, что составляет 58 % от массы первоначальной субстанции, $T_{пл}$ 215–219 °С ([16]: $T_{пл}$ 222–223 °С), а содержание ДАБ в полученном образце составило 95 %, по данным ХМС.

В результате очистки субстанций методом колоночной хроматографии, согласно данным ХМС, содержание бетулина в пробе с 94 % увеличилось до 98 % (способ 2а), а ДАБ в пробе с 89 % повысилось до 95 % (способ 2б). Следовательно, можно сделать вывод о том, что хроматографический способ очистки перечисленных ПТ с использованием окиси алюминия наиболее предпочтителен по сравнению с традиционным методом перекристаллизации, где было отмечено повышение содержания основных веществ в образцах всего на 2 % (способы 1а и 1б).

Вследствие того, что способ очистки субстанций ПТ перекристаллизацией показал меньшую эффективность (как нами рассмотрено на примере образцов бетулина и ДАБ), очистку тритерпеноида олеанового ряда — аллобетулина — осуществляли только методом колоночной хроматографии (способ 2в).

Способ 2в. Очистка аллобетулина методом колоночной хроматографии с Al_2O_3

Для очистки неочищенного аллобетулина (рис. 3) массой 0,8 г (содержание 90 %) методом колоночной хроматографии в качестве сорбента использовали окись алюминия, в качестве подвижной фазы — ацетон. Собирали фракции, содержащие аллобетулин, с R_f 0,37 в системе В (ТСХ), детектирование пятен осуществляли модифицированным реактивом Эрлиха (Г). Из объединенных фракций

отгоняли растворитель, остаток сушили. Получили субстанцию в виде светло-бежевых кристаллов массой 0,49 г (61 %), $T_{пл}$ 262–265 °С ([17]: $T_{пл}$ 264–266 °С), содержание аллобетулина в данном образце составило 97 % согласно данным метода ХМС.

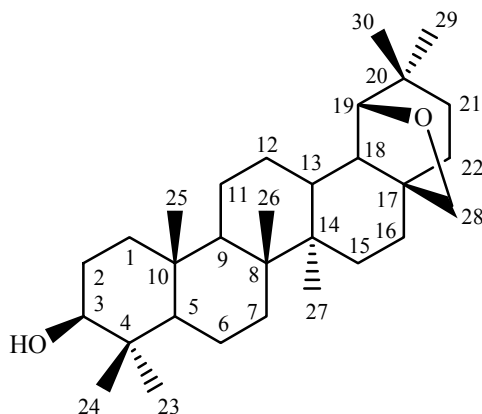


Рисунок 3. Структурная формула аллобетулина

Результатом очистки субстанции аллобетулина методом колоночной хроматографии, согласно данным ХМС, стало увеличение содержания основного вещества в пробе с 90 % до 97 % (способ 2в), что дополнительно подтвердило эффективность предложенного нами способа.

Спектральные характеристики соединений

Бетулин (3β,28-дигидрокси-20(29)-лупен):

ИК-спектр (КВг, ν , см^{-1}): 3359 (O–H), 3078, 2944, 2870 (C–H), 1695, 1644, 1457, 1374, 1029, 884, 759.

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J/Гц): 0.65–2.15 (complex, CH_3 , CH_2 , CH), 2.38 (1H, dt, H-19, $J = 11.5, 6.3$), 3.18 (1H, dd, H-3, $J = 11.2, 5.4$), 3.32 и 3.79 (2H, 2d, H-28, $J = 10.8$), 4.58 и 4.68 (2H, s, H-29).

Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 442 (M^+ , 6), 411 (16), 363 (16), 203 (56), 189 (100), 135 (74), 121 (80), 95 (90), 69 (56), 55(67).

Диацетат бетулина (3β,28-диацетокси-луп-20(29)-ен):

ИК спектр (КВг, ν , см^{-1}): 3066 (C=C), 2945, 2869 (C–H), 1733 (C=O), 1457, 1367, 1241, 1018, 979, 889.

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J/Гц): 0.74–2.15 (complex, CH_3 , CH_2 , CH), 2.43 (1H, dt, H-19, $J = 10.8, 5.7$), 3.84 и 4.24 (2H, 2d, H-28, $J = 11.1$), 4.46 (1H, dd, H-3, $J = 9.3, 3.6$), 4.58 и 4.68 (2H, s, H-29).

Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 526 (M^+ , 1), 466 (38), 423 (45), 363 (30), 227 (21), 203 (38), 189 (100), 161 (47), 135 (69), 121 (83), 91 (74), 67 (42), 55 (42).

Аллобетулин (3β-гидрокси-19β,28-эпокси-18α-олеан):

ИК-спектр (КВг, ν , см^{-1}): 3430 (O–H), 2939, 2867 (C–H), 1450, 1386, 1375, 1361, 1301, 1264, 1206, 1138, 1076, 1041, 1008, 988, 973, 946, 929, 888, 813, 769.

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д., J/Гц): 0.65–1.82 (complex, CH_3 , CH_2 , CH), 3.19 (1H, m, H-3), 3.44 (1H, d, $J=6.5$, H-28), 3.52 (1H, s, H-19), 3.77 (1H, d, $J=6.5$, H-28).

Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн.}}$, %): 442 (M^+ , 28), 424 (28), 411 (14), 371 (26), 355 (7), 220 (18), 207 (74), 189 (100), 177 (37), 148 (49), 134 (58), 121 (53), 107 (58), 95 (84), 81 (88), 69 (72), 55 (58).

Выводы

В данной работе рассмотрены способы очистки некоторых пентациклических тритерпеноидов лупанового и олеанового рядов, проведено сравнение методов и сделано заключение о наиболее эффективных и предпочтительных способах.

Для очистки субстанций бетулина, диацетата бетулина и аллобетулина были выбраны методы перекристаллизации и колоночной хроматографии. Показано, что очистка пентациклических тритерпеноидов методом колоночной хроматографии позволяет получить субстанции более высокой чистоты.

ты, которые могут быть использованы в спектральных, электрохимических (АОА, ВА) и микробиологических исследованиях, а также для получения на их основе новых биологически активных соединений.

Достоинствами предложенного хроматографического способа очистки тритерпеноидов являются простота исполнения, экспрессность и высокая чистота полученных образцов.

На основе полученных нами данных предложенный хроматографический метод очистки как наиболее универсальный может быть рекомендован для приготовления чистых субстанций других представителей лупанового и олеанового рядов, а также их синтетических производных.

Список литературы

- 1 Абышев А.З. Исследование химического состава экстракта коры березы *Cortex Betula* сем. *Betulaceae* / А.З. Абышев, Э.М. Агаев, А.Б. Гусейнов // *Хим.-фарм. журн.* — 2007. — Т. 41, № 8. — С. 22–26.
- 2 Толстиков Г.А. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность / Г.А. Толстиков, О.Б. Флехтер, Э.Э. Шульц, Л.А. Балтина, А.Г. Толстиков // *Химия в интересах устойчивого развития.* — 2005. — № 13. — С. 1–30.
- 3 Krasutsky P. Birch Bark Research and Development // *Natural Product Reports.* — 2006. — Vol.6, No. 23. — P. 919–942.
- 4 Кузнецов Б.Н. Совершенствование методов выделения, изучения состава и свойств экстрактов березовой коры / Б.Н. Кузнецов, С.А. Кузнецова, В.А. Левданский, И.Г. Судакова, О.Ф. Веселова // *Химия в интересах устойчивого развития.* — 2005. — № 3. — С. 391–400.
- 5 Manez S. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation / S. Manez, M.C. Recio, R.M. Giner, J-L. Rios // *European Journal of Pharmacology.* — 1997. — Vol. 334. — P. 103–105.
- 6 Gongga Y. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses / Y. Gongga, K.M. Rajb, C.A. Luscombe, I. Gadawska, T. Tama, J. Chua et al. // *Antiviral Research.* — 2004. — Vol. 64. — P. 127–130.
- 7 Pyo J.S. Anti-cancer effect of betulin on a human long cancer cell line: a pharmacoproteomic approach using 2D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem mass spectrometry / J.S. Pyo, S.H. Roh, D.K. Kim, J.G. Lee, Y.Y. Lee, S.S. Hong et al. // *Planta Medica.* — 2009. — Vol. 75. — P. 127–131.
- 8 Василенко Ю.К. Фармакологические свойства тритерпеноидов коры березы / Ю.К. Василенко, В.Ф. Семенченко, Л.М. Фролова // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* — 1993. — Т. 56, № 4. — С. 53–55.
- 9 Флехтер О.Б. Получение бетулиновой кислоты из экстракта бетулина. Противовирусная и противовязвенная активность некоторых родственных терпеноидов / О.Б. Флехтер, Л.Р. Нигматуллина, Л.А. Балтина, Л.Т. Карачурина, Ф.З. Галин, Ф.С. Зарудий и др. // *Хим.-фарм. журн.* — 2002. — Т. 36, № 9. — С. 26–28.
- 10 Thibeault D. Synthesis and structure–activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupane-type β -O-monodesmosidic saponins starting from betulin / D. Thibeault, C. Gauthier, J. Legault, J. Bouchard, P. Dufour, A. Pichette // *Bioorg. Med. Chem.* — 2007. — Vol. 15. — P. 6144–6157.
- 11 Lugemwa F.N. A Heliothis zea Antifeedant from the Abundant Birchbark Triterpene Betulin / F.N. Lugemwa, F.-Y. Huang, M.D. Bentley, M.J. Mendel, A.R. Alford // *J. Agric. Food Chem.* — 1990. — Vol. 38. — P. 493–496.
- 12 Соколянская М.П. Антифидантная активность аллобетулина и его производных в отношении личинок колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*) / М.П. Соколянская, Н.И. Медведева, О.Б. Флехтер, Г.В. Беньковская, А.Г. Николенко, Ф.З. Галин // *Агрохимия.* — 2005. — № 12. — С. 48–50.
- 13 Михайленко М.А. Получение и исследование физико-химических свойств сольватов бетулина / М.А. Михайленко, Т.П. Шахтштейндер, М.Е. Брезгунова, В.А. Дребушак, С.А. Кузнецова, В.В. Болдырев // *Химия растительного сырья.* — 2010. — № 2. — С. 63–70.
- 14 Жук В.В. Перекристаллизация экстрактов бетулина из высококипящих углеводородных растворителей / В.В. Жук, В.А. Яновский, Е.А. Яновская, А.А. Бакибаев, О.С. Андриенко, Ш.М. Шарафеев и др. // *Химия растительного сырья.* — 2012. — № 2. — С. 73–78.
- 15 Кузнецова С.А. Выделение бетулина из бересты березы и изучение его физико-химических и фармакологических свойств / С.А. Кузнецова, Г.П. Скворцова, Ю.Н. Маляр, Е.С. Скурыдина, Е.Ф. Веселова // *Химия растительного сырья.* — 2013. — № 2. — С. 93–100.
- 16 Кузнецова С.А. Получение диацетата бетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантной активности / С.А. Кузнецова, Н.Ю. Васильева, Г.С. Калачева, Н.М. Титова, Е.С. Редькина, Г.П. Скворцова // *Журн. Сиб. федерал. ун-та. Сер. Химия.* — 2008. — Т. 1. — С. 151–165.
- 17 Пат. RU 2402561 / Казакова О.Б., Медведева Н.И., Казаков Д.В., Толстиков Г.А., заявл. 13.05.2009; опубл. 27.10.2010, Бюл. № 30.

С.С. Калиева, Е.А. Мамаева, Е.Е. Нурпейис, А.А. Бакибаев,
А.К. Ташенов, М.К. Заманова, Т.С. Кең

Кейбір пентациклді тритерпеноидтарды тазалаудың әдістері

Мақалада қайта кристалдау және бағаналы хроматография әдістерін қолданып лупан және олеан қатарының негізгі өкілдерін (бетулин, бетулиннің диацетаты және аллобетулин) тазалаудың тәсілдері қарастырылды, сондай-ақ осы әдістерге салыстыру жүргізілді және ең тиімді және қолайлы әдістер бойынша тұжырым жасалды. Пентациклді тритерпеноидтардың техникалық субстанцияларын қайта кристалдау әдісімен тазалаудың тиімсіздігі атап өтілді, себебі, үлгілердегі негізгі компоненттердің үлесі осы әдіспен тазалағанда 2 % ғана артады, сонымен қатар тазалау барысында елеулі шығындар байқалды. Сорбент ретінде алюминий оксидін қолданып, бағаналы хроматография әдісімен аталған субстанцияларды тазалағанда жоғары нәтижеге жететіндігі анықталды. Бұл жағдайда хромато-масс-спектрлік талдау нәтижелеріне сәйкес, үлгідегі негізгі заттың үлесі 4–7 % артатындығы белгілі болды. Осы әдіс бетулинді, бетулиннің диацетатын және аллобетулинді ілеспелі қоспалардан тазалау кезіндегі тиімділігін және олардың таза субстанцияларын алуға мүмкіндік беретіндігін, ары қарай органикалық синтезде, электрохимиялық, микробиологиялық және басқа да зерттеулер бағытында қолдануға болатындығын көрсетеді. Тритерпеноидтарды тазалауда ұсынылған хроматографиялық әдістің құндылықтары орындалуының қарапайымдылығы, жеделдігі, алынған үлгілердің жоғары тазалығы. Субстанцияларды тазалауда жүргізілген әдістердің тиімділігін салыстыру үшін заманауи физикалық және химиялық әдістерінің талдаулары қолданылды. Алынған нәтижелердің негізінде авторлар ұсынып отырған тазалаудың хроматографиялық әдісін тиімді әдіс ретінде пентациклді тритерпеноидтардың лупан және олеан қатарындағы басқа өкілдерінің таза субстанцияларын алу үшін қолдануға болады.

Кілт сөздер: пентациклді тритерпеноидтар, бетулин, бетулиннің диацетаты, аллобетулин, қайта кристалдау, бағаналы хроматография.

S.S. Kaliyeva, E.A. Mamayeva, Ye.E. Nurpeiis, A.A. Bakibayev,
A.K. Tashenov, M.K. Zamanova, T.S. Kets

Methods for treating some pentacyclic triterpenoids

This article describes the methods of purification the most important representatives of a lupane and olean series (betulin diacetate betulin and allobetulin) by using recrystallization and column chromatography methods, as well as a comparison of methods and it was concluded about the most effective and preferred methods. It was observed, that the purification of technical substances for pentacyclic triterpenoids by recrystallization method is not efficient, because, the content of the main components in the samples with using this method increases by only 2 %, and there are significant losses during purification. It is established that the best result is achieved by purification of these substances by column chromatography using aluminum oxide as a sorbent. In this case, according to the chromatography-mass spectrometric analysis, the fixed increasing in the content of the main substance in the sample by 4–7 %. It is shown, that this method is convenient for the purification of betulin, betuline diacetate and allobetulin from concomitant impurities and makes it possible to obtain their pure substances suitable for further use in organic synthesis, electrochemical, microbiological, spectral and other methods of investigation. The advantages of the proposed method for the chromatographic purification of triterpenoids are: simplicity of execution, rapidity and high purity of the obtained samples. To compare the effectiveness of the methods of purification of substances were used modern physical and chemical methods of analysis. On the basis of the results, the authors proposed a chromatographic purification method as the most effective can be used for the preparation of pure substances to other representatives of pentacyclic triterpenoids lupane and olean series.

Keywords: pentacyclic triterpenoids, betulin, betulin diacetate, allobetulin, recrystallization, column chromatography.

References

- 1 Abyshev, A.Z., Agaev, E.M., & Guseinov, A.B. (2007). Issledovanie himicheskogo sostava ekstrakta kory berezy Cortex Betula sem. Betulaceae [Investigation of the chemical composition of birch bark extract Cortex Betula fam. Betulaceae] *Himikofarmatsevticheskii zhurnal — Chemical-Pharmaceutical Journal*, 41, 8, 22–26 [in Russian].
- 2 Tolstikov, G.A., Flekhter, O.B., Shul'ts, E.E., Baltina, L.A., & Tolstikov, A.G. (2005). Betulin i ego proizvodnye. Himiya i biologicheskaya aktivnost [Betulin and its derivatives. Chemistry and Biological Activity] *Himiya v interesah ustoychivogo razvitiya — Chemistry for Sustainable Development*, 13, 1–30 [in Russian].
- 3 Krasutsky, P. (2006). Birch Bark Research and Development. *Nat. Prod. Rep.*, 6, 23, 919–942.

- 4 Kuznetsov, B.N., Kuznetsova, S.A., Levanskii, V.A., Sudakova, I.G., & Veselova, O.F. (2005). Sovershenstvovanie metodov vydeleniia, izucheniia sostava i svoistv ekstraktov berezovoi kory [Improvement of methods of allocation, studying of structure and properties of extracts of birch bark] *Himiya v interesah ustoichivogo razvitiya — Chemistry for Sustainable Development*, 3, 391–400 [in Russian].
- 5 Manez, S., Recio, M.C., Giner, R.M., & Rios, J.-L. (1997). Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 334, 103–105.
- 6 Gong, Y., Rajb, K.M., Luscombe, C.A., Gadawska, I., Tama, T., & Chua, J. et al. (2004). The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*, 64, 127–130.
- 7 Pyo, J.S., Roh, S.H., Kim, D.K., Lee, J.G., Lee, Y.Y., & Hong, S.S. et al. (2009). Anti-cancer effect of betulin on a human long cancer cell line: a pharmacoproteomic approach using 2D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem mass spectrometry. *Planta Med.*, 75, 127–131.
- 8 Vasilenko, Yu.K., Semenchenko, V.F., & Frolova, L.M. (1993). Farmakologicheskie svoistva triterpenoidov kory berezy [Pharmacological properties of triterpenoid of bark of a birch] // *Ekspperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya — Experimental and clinical pharmacology*, 56(4), 53–55 [in Russian].
- 9 Flekhter, O.B., Nigmatullina, L.R., Baltina, L.A., Karachurina, L.T., Galin, F.Z., & Zarudii, F.S. et al. (2002). Poluchenie betulinovoi kisloty iz ekstrakta betulina. Protivovirusnaia i protivoiazvennaia aktivnost nekotorykh rodstvennykh terpenoidov [Receiving betulin acid from extract of a betulin. Antiviral and antiulcer activity of some related terpenoid] // *Himiko-farmatsevticheskii zhurnal — Chemical-Pharmaceutical Journal*, 36(9), 26–28 [in Russian].
- 10 Thibeault, D., Gauthier, C., Legault, J., Bouchard, J., Dufour, P., & Pichette, A. (2007). Synthesis and structure–activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3 β -O-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 6144–6157.
- 11 Lujemwa, F.N., Huang, F.-Y., Bentley, M.D., Mendel, M.J., & Alford, A.R. (1990). A Heliothis zea Antifeedant from the Abundant Birchbark Triterpene Betulin. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 493–496.
- 12 Sokolyanskaya, M.P., Medvedeva, N.I., Flekhter, O.B., Ben'kovskaya, G.V., Nikolenko, A.G., & Galin, F.Z. (2005). Antifidantnaia aktivnost allobetulina i ego proizvodnykh v otnoshenii lichinok koloradskogo zhuka (Leptinotarsa decemlineata) [Antifidant activity of allobetulin and its derivatives against the larvae of the Colorado beetle (Leptinotarsa decemlineata)] *Agrohimiya — Agrochemistry*, 12, 48–50 [in Russian].
- 13 Mihailenko, M.A., Shahtshneider, T.P., Brezgunova, M.E., Drebuschak, V.A., Kuznetsova, S.A., & Boldyrev, V.V. (2010). Poluchenie i issledovanie fiziko-khimicheskikh svoistv solvatov betulina [Obtaining and studying the physical and chemical properties of betulin solvates] *Himiya rastitel'nogo syr'ya — Chemistry of plant raw materials*, 2, 63–70 [in Russian].
- 14 Zhuk, V.V., Yanovskii, V.A., Yanovskaya, E.A., Bakibaev, A.A., Andrienko, O.S., & Sharafiev, Sh.M. et al. (2012). Perekriztallizatsiia ekstraktov betulina iz vysokokipiashchikh uglevodorodnykh rastvoritelei [Recrystallization of extracts of betulin from high-boiling hydrocarbon solvents] *Himiya rastitel'nogo syr'ya — Chemistry of plant raw materials*, 2, 73–78 [in Russian].
- 15 Kuznetsova, S.A., Skvortsova, G.P., Malyar, Yu.N., Skurydina, E.S., & Veselova, E.F. (2013). Vydelenie betulina iz beresty berezy i izuchenie ego fiziko-khimicheskikh i farmakologicheskikh svoistv [Isolation of betulin from the birch bark and the study of its physico-chemical and pharmacological properties] *Himiya rastitel'nogo syr'ya — Chemistry of plant raw materials*, 2, 93–100 [in Russian].
- 16 Kuznetsova, S.A., Vasilieva, N.Yu., Kalacheva, G.S., Titova, N.M., Redkina, E.S., & Skvortsova, G.P. (2008). Poluchenie diacetata betulina iz beresty kory berezy i izuchenie ego antioksidantnoi aktivnosti [The preparation of betulin diacetate from the birch bark and the study of its antioxidant activity] *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Seriya Himiya — Journal of Siberian Federal University. Ser. Chemistry*, 1, 151–165.
- 17 Kazakova, O.B., Medvedeva, N.I., Kazakov, D.V., & Tolstikov, G.A. (2009, 13.05. zayavl.; 2010, 27.10. opubl.). Patent RU 2402561 *Bull. № 30* [in Russian].