

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ХИМИИ

Кафедра органической и экологической химии

ДОПУЩЕНО К ЗАЩИТЕ В ГЭК
И ПРОВЕРЕНО НА ОБЪЕМ
ЗАИМСТВОВАНИЯ

и.о. заведующего кафедрой
канд. тех. наук, доцент

 Г.Н. Шигабаева

«05» июня 2017 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

04.04.01 Химия

Магистерская программа «Химия нефти и экологическая безопасность»

Выполнила работу

Студентка 2 курса

очной формы обучения



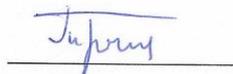
Чуклина

Олеся

Андреевна

Научный руководитель

к.х.н., доцент



Третьяков

Николай

Юрьевич

Рецензент

Зав. кафедрой экологии и генетики

Института биологии ТюмГУ

д.б.н., профессор



Пак

Ирина

Владимировна

Тюмень, 2017

Реферат

с. 56, рис. 32, табл. 5, библи. 48.

Оптимизирована методика количественного определения бетулина в опытных образцах на аналитическом и микроколоночном хроматографе. Выявлен наиболее эффективный окислитель бихромат калия/серная кислота в присутствии оксида алюминия (выход конечного продукта – 77%). Восстановлением бетулоновой кислоты боргидридом натрия в среде диоксана получена бетулиновая кислота выходом 85%. Хроматографическими и спектральными методами доказана чистота промежуточных и конечных продуктов. Впервые выполнены определения молекулярной массы бетулиновой кислоты методом прямого масс-спектрометрического анализа.

Ключевые слова: бетулин, бетулоновая кислота, бетулиновая кислота, реактив Джонса, хроматографические методы анализа, ИК-спектроскопия.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИ.....	6
I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	8
1.1 Получение бетулина из отходов производства фанеры.....	8
1.1.1. Бетулин. Химия и биологическая активность.....	8
1.1.2. Модификация методов экстракции бетулина.....	9
1.1.3. Актуальная методика получения бетулина.....	10
1.2. Анализ бетулина физико-химическими методами.....	13
1.3. Обзор литературных данных по окислению бетулина.....	17
1.3.1. Катализаторы окисления.....	18
1.3.1.1. Окисление бетулина до бетулоновой кислоты реактивом Джонса..	20
1.3.1.2. Окисление бетулина до бетулоновой кислоты $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$ в водно-ацетоновой среде на сорбентах кислотного характера.....	21
1.4. Катализаторы восстановления.....	24
II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	28
2.1. Определение концентрации бетулина и продуктов его окисления/восстановления.....	28
2.1.1. Оборудование, реактивы, материалы.....	28
2.1.2. Подготовка к выполнению измерения.....	29
2.1.2.1. Условия хроматографирования (ДМ-детектор) «Agilent 1100».....	29
2.1.2.2. Условия хроматографирования (УФ-детектор) «Милихром А-02»..	30
2.2. Окислительные смеси.....	30
III. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	31
3.1. Отработка методики анализа бетулина методом ВЭЖХ.....	31
3.1.1. Определение оптимальных режимов эффективного разделения бетулина методом ВЭЖХ.....	31
3.1.2. Очистка технического бетулина методом колоночной хроматографии.....	33
3.1.3. Окисление бетулина.....	34

3.1.3.1. Окисление бетулина реактивом Джонса (методика 1).....	34
3.1.3.2. Окисление бетулина хромовым ангидридом в уксусной кислоте (методика 2).....	37
3.1.3.3. Окисление бетулина до бетулоновой кислоты $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$ в присутствии гранул Al_2O_3 (методика 3).....	37
3.1.3.4. Окисление бетулина до бетулоновой кислоты $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$ на силикагеле (методика 4).....	39
3.1.4. Восстановление бетулоновой кислоты боргидридом натрия.....	40
3.1.5. Качественное и количественное определение концентрации бетулоновой кислоты.....	41
3.1.6. Восстановление бетулоновой кислоты.....	44
3.2. Масс-спектрометрический анализ бетулиновой кислоты.....	49
ВЫВОДЫ.....	51
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	52

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КМФП – катализаторы межфазного переноса

ТЭБАХ – триэтилбензиламмонийхлорид

ТБАБ – тетрабутиламмонийбромид

ТБАИ – тетрабутиламмониййодид

Приставка НПВО – приставка нарушенного полного внутреннего отражения

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВВЕДЕНИЕ

Активно развивающимся направлением органического синтеза является применение природных соединений, в качестве объектов химических преобразований, для дальнейшего синтеза биологически активных агентов. Лекарственные препараты синтезированные, путем химической модификации природных соединений, обладают рядом преимуществ, по сравнению с синтетическими аналогами. Они малотоксичны, обеспечивают разностороннее действие на организм, практически не вызывают побочных эффектов. Доступность природных метаболитов, которая обусловлена распространенностью источников и технологичностью методов выделения природных веществ, также является немаловажным и привлекательным фактором. Особенно ценно то, что большинство перспективных объектов химической трансформации можно получать практически в неограниченном количестве, например, из отходов лесной и деревоперерабатывающей промышленности [1-3].

Особо ценным продуктом считается кора березы, которая является крупнотоннажным отходом на предприятиях, по деревопереработке, производству фанеры и древесного угля. Береста – внешний слой коры, является рекордсменом среди других видов растительного сырья, по содержанию биологически активных тритерпеновых соединений. В составе тритерпенов бересты преобладает бетулин, содержание которого составляет 30-40% [4].

Особенный интерес представляет бетулиновая кислота, которая обладает ценной биологической активностью, проявляемой как кислотой, так и ее многочисленными производными [3, 4].

Появление малых инновационных предприятий, перерабатывающих отходы производства фанеры, стимулирует разработку технологию выделения и методик количественного определения бетулина в опытных партиях.

Помимо этого, разработка новых способов химического превращения бетулина в более ценные продукты является отдельным исследованием.

Целью настоящей диссертации является: Разработка методик количественного анализа технического бетулина, производства ООО «СБК» (г. Тюмень) и его переработки в бетулиновую кислоту.

Задачи:

- Оптимизировать методику количественного определения бетулина в опытных образцах на аналитическом и микроколоночном хроматографе.
- Исследовать реакцию окисления бетулина в бетулоновую кислоту в присутствии различных окислителей.
- Получить бетулиновую кислоту.
- Проверить и доказать хроматографическими и спектральными методами чистоту промежуточных и конечных продуктов.
- Разработать методику определения молекулярной массы бетулиновой кислоты методом прямого масс-спектрометрического анализа и доказать эффективность получения бетулиновой кислоты из опытных образцов бетулина производства ООО «СБК» (г. Тюмень).

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Получение бетулина из отходов производства фанеры

В настоящее время на предприятиях осуществляющих производство фанеры, образуется значительное количество отходов березовой коры, которые практически не используются и в лучшем случае сжигаются.

1.1.1. Бетулин. Химия и биологическая активность

Бетулин (3 β ,28-дигидрокси-20(29)-лупен) является тритерпеноидом лупанового ряда. Основной источник бетулина – береста (внешний слой коры) где его содержание может достигать 30-35% в зависимости от вида берез [3, 4].

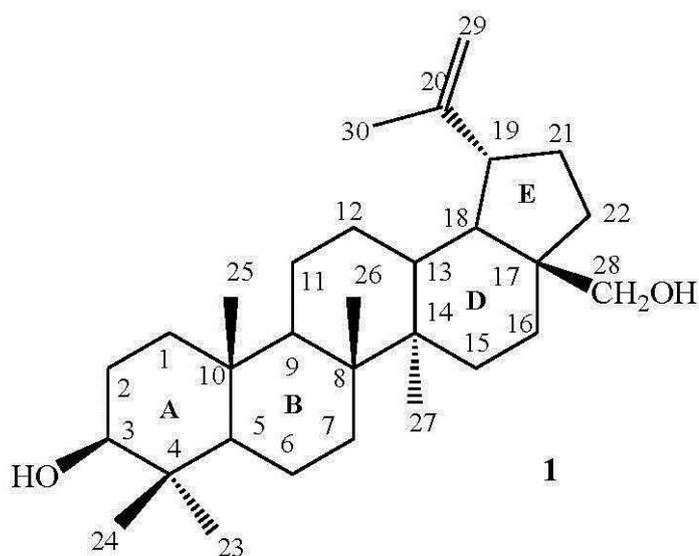


Рис. 1.1.1. Структурная формула бетулина.

Функциональные группы в бетулине – первичная и вторичная гидроксильные группы и двойная связь в изопропенильной группе у пятичленного кольца. Способность бетулина вступать в реакции, характерные для спиртов (этерификации, окисления), и реакции с участием изопропенильной группы (изомеризации, восстановления, окисления) обуславливает наличие гидроксильных групп и двойной связи в изопропенильной группе [5].

Неуклонно возрастающий интерес к бетулину связан, прежде всего, широким спектром биологической активности [4]. Доказано, что бетулин и ряд его производных обладают антисептической, антиоксидантной, противовоспалительной, противоопухолевой, гепатопротекторной и другими видами биологической активности [4-8]. В настоящее время ведутся интенсивные поиски новых антибактериальных и противовирусных препаратов на основе бетулина, в том числе обладающих анти-ВИЧ-активностью [4, 9, 10]. Экстракты бетулина, нашли широкое применение в косметологии и фармакологии.

1.1.2. Модификация методов экстракции бетулина

Очевидно, что подобные исследования диктуют потребность в соответствующих методах получения исходного бетулина в достаточных количествах, а также в простых способах очистки его от сопутствующих минорных примесей. Большинство современных способов выделения бетулина основаны на методах экстракции бересты различными растворителями [11-13]. Применение низших алифатических спиртов, хлороформа, ацетона, этилацетата, дихлорметана в качестве растворителей приводят к образованию сольватных комплексов с бетулином, что затрудняет его идентификацию как индивидуального соединения. Также следует отметить малую селективность этих растворителей, относительно сопутствующих бетулину примесей, таких как лупеол, полифенолы и окисленные формы бетулина, которые также растворимы в данных растворителях и ухудшают качество получаемого бетулина [14].

Наиболее эффективным, из предложенных методов экстракции бетулина, является метод – тонкопленочной профазной экстракции [11,15], позволяющий интенсифицировать экстракцию за счет проведения процесса в тонком слое при орошении слоя бересты конденсатом экстрагента, а так же за счет повышенного градиента концентраций экстрактивных веществ в системе экстрагент – береста. Удобным способом очистки бетулина является перекристаллизация его

экстрактов из высококипящих алифатических углеводородов, что позволяет получить продукт чистотой 88,2-98,3%, пригодный для дальнейшего использования в органическом синтезе. Потери бетулина в маточнике минимальны, составляют 1,6 – 1,8% [16,17].

Также достоинствами метода являются: сокращение расхода экстрагента, более полная регенерация экстрагента, облегчение выделения целевого продукта из экстрагента, упрощение технологической и аппаратурной схемы, снижение пожаро-и взрывоопасности процесса [18].

1.1.3. Актуальная методика получения бетулина

Технологию экстракции и очистки производили на лабораторной установке – экстрактор (рис. 1.1.3).

Установка представляет собой экстракционную колонну из кварцевого стекла с внутренним диаметром 90 мм и высотой 800 мм (1), сверху которой присоединен обратный холодильник (2), а снизу – куб-приемник объемом 5 л (3), оснащенный штуцером для ввода острого водяного пара. Куб-приемник обогревается нагревателем (4). Процесс экстракции осуществляется следующим образом: по мере нагрева пары экстрагента проходят через слой измельченной бересты, конденсируются в обратном холодильнике (2) и через вентиль (5) возвращаются в экстракционную колонну. Конденсат орошает измельченную бересту, проходя через ее слой, обогащается экстрактивными веществами и стекает в куб-приемник. Затем экстрагент вновь испаряется и возвращается в экстракционную колонну, а растворенный экстракт выпадает в осадок в виде гранулята. Ход процесса контролируется по наличию сухого остатка в стекающем конденсате (6) на выходе экстракционной колонны [16, 19].

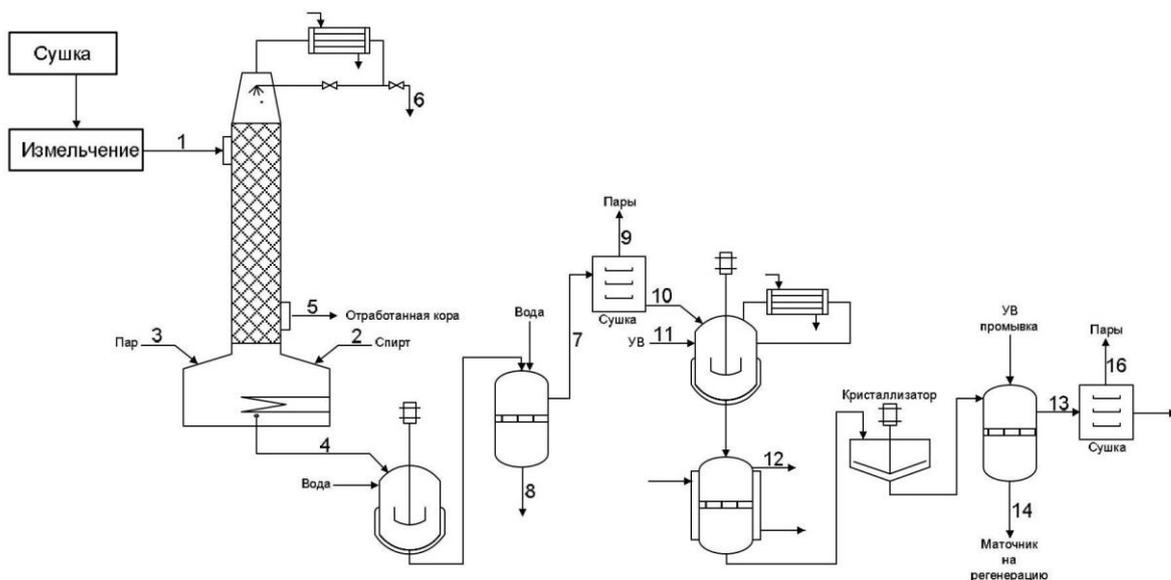


Рис.1.1.2. Технологическая схема процесса получения бетулина.

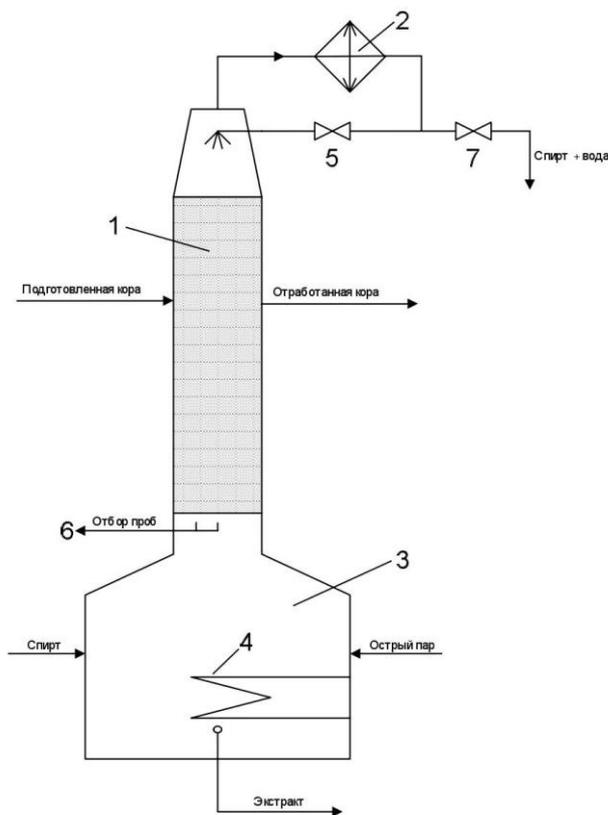


Рис. 1.1.3. Экстрактор.

В качестве исходного сырья использовали, предварительно высушенную бересту березы, при температуре 105 °С, до постоянной массы. Остаточная влажность составляла 1,8%. Высушенная береста измельчается в ножевой мельнице до частиц размерами 3-5 мм [16].

Подготовленная береста 1 и спирт-ректификат 2 загружается в экстрактор, где осуществляется процесс экстракции [11, 15]. В качестве экстрагента использовали 86%-ный этанол, что обусловлено особенностями ректификации водного раствора спирта. Кроме того, присутствие небольшого количества воды в спирте приводит к увеличению коэффициента извлечения [18]. Продолжительность экстракции 4 ч. После окончания экстракции маточник 4 направляют на высаживание в емкость, которое осуществляется путем разбавления суммарного экстракта водой. Для удаления спирта из бересты в куб-приемник подается острый водяной пар 3 и отгоняется водно-спиртовая фракция 6 из бересты в экстракционную колонну для последующей регенерации. Регенерированный спирт используется повторно. Отработанная береста 5 выгружается из колонны и может быть использована для дальнейшего извлечения из нее жирных оксикислот [20].

После высаживания суспензия направляется на фильтр, осадок на фильтре промывается водой, жидкую фазу 8 направляют на регенерацию спирта. Твердый остаток 7 высушивается при температуре 105 °С в сушилке.

Полученный сухой экстракт подвергается перекристаллизации из декана. Известно, что перекристаллизацию бетулин-содержащих экстрактов удобно в среде высококипящих углеводородных растворителей, таких как нонан или декан, или их смесей [15, 16]. Также для удешевления процесса перспективным является применение коммерчески доступных изопарафинов фракции С10 – С12 с температурой перегонки 173 – 193 °С, например, нефрас И2 – 190/320. Согласно технологической схеме, сухой суммарный экстракт 10 загружается в обогреваемую емкость и растворяется в среде кипящего углеводородного растворителя 11, полученный раствор подвергается горячему фильтрованию на фильтре для отделения нерастворимых примесей 12. Горячий фильтрат, содержащий бетулин, помещается в кристаллизатор и медленно охлаждается захлажденной водой до температуры 5 – 10 °С. Выпавший в осадок бетулин отделяется фильтрованием на фильтре и промывается легкокипящим углеводородным растворителем, например, гептаном. Применение

алифатических нефтяных растворителей состава C5 – C7, например нефрас П1-65/75 или нефрас С3 – 94/99 является экономически целесообразным. Маточник 14 направляется на регенерацию углеводородов. Твердый остаток после промывки 13 высушивается в вакуумной сушилке при температуре 100-105 °С, готовый продукт – бетулин [16, 18-20].

1.2. Анализ бетулина физико-химическими методами

Бетулин – основной объект исследования, полученный лабораторными методами, проверяется на подлинность, для достоверности его структуры с целью дальнейших экспериментальных работ. Идентификацию бетулина проводят следующими методами контроля:

1. Температуру плавления определяют с помощью прибора для автоматического определения точки плавления Melting Point System MP50 Mettler Toledo (рис. 1.2.1).

$T_{пл.}$ бетулина – 255-262 °С.



Рис. 1.2.1. Внешний вид прибора для определения точки плавления Melting Point System MP50 Mettler Toledo.

2. Для регистрации ИК-спектров бетулина используют спектрометр фирмы Agilent Technologies марка Cary 600 Series FTIR Spectrometr (рис.1.2.2) и на приставке НПВО (рис. 1.2.3). Измерения проводятся в диапазоне от 3600 до 400 см^{-1} .



Рис. 1.2.2. Спектрометр Agilent Technologies Cary 600 Series FTIR Spectrometr.



Рис. 1.2.3. Приставка НПВО.

В ИК-спектре бетулина наблюдаются полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям спиртовых и гидроксильных групп 3226–3509 см^{-1} . Валентные колебания С-Н группы проявляется при 2936 см^{-1} (=С-Н), 1010 см^{-1} , (С-О), 1642(С=С).

3. ЯМР ^1H измерения проводятся на ЯМР-Фурье-спектрометре Avance AV 300 фирмы Bruker (Германия) (рис. 1.2.4).



Рис. 1.2.4. Внешний вид ЯМР-Фурье-спектрометра

^1H ЯМР – спектр бетулина (растворитель CDCl_3) содержит следующие химические сдвиги: 4.59 с, 4.71 с ($2\text{H}, \text{C}_{29}\text{H}_2$), 3.10 д, 3.25 д ($2\text{H}, \text{C}_{28}\text{H}_2\text{-OH}$), 3.21-3.15 м ($\text{CH-OH}, 1\text{H}$), 2,35 м ($1\text{H}, \text{C}_{19}\text{H}$), 0.7-2.0 м ($6\text{CH}_3, 10\text{CH}_2, 5\text{CH}$)

4. Для более детального анализа бетулина используют метод масс-спектрометрии (МС). Количественный анализ структуры бетулина может проводиться на масс-спектрометре AutoSpec (ESI, EI) (рис. 1.2.5).



Рис. 1.2.5. Внешний вид масс-спектрометра AutoSpec (ESI, EI).

Основным ионом, совпадающим с его молекулярной массой, является m/z 442. Принадлежность соединения к лупановому ряду определяется по

характеру фрагментации исследуемого вещества (m/z 442 (6%), 363 (9%), 245 (14%), 203 (56%), 189 (100%), 147 (45%), 121 (75%), 95 (88%), 79 (68%), 55(66%). Результаты ГХМС показывают процентное содержание бетулина в исследуемых образцах.

5. Определение в исследуемых образцах бетулина и сопутствующих ему соединений (бетулиновой кислоты, эритродиола и лупеола) осуществляют методом ВЭЖХ. Анализ проводится с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1220 Infinity LC (Agilent, США) (рис. 1.2.6). Хроматографическое разделение осуществлялось на колонке Zorbax Eclipse Plus C18 3Ч150 мм, 3,5 мкм (Agilent, США).



Рис. 1.2.6. Внешний вид ВЭЖХ-системы Agilent 1220 Infinity LC (Agilent, США).

6. Для исследования образцов бетулина методом ВЭЖХ так же используют жидкостной хроматограф «Милюхром А-02» со спектрофотометрическим сканирующим детектором УФ-диапазона на колонке из нержавеющей стали (2,0 Ч 75 мм), упакованной силикагелем с размером зерна 5,0 мкм, типа Prontosil C 18 AQ. Температура колонки ($35,0 \pm 0,3$) °С.

Подвижная фаза ацетонитрил – деионизированная вода в соотношении 86:14, скорость подачи элюента 200 мкл/мин. Обработка полученных результатов осуществлялась программой «МультиХром-СПЕКТР» для Windows (Ampersand Ltd). Время регистрации хроматограммы 7,5 мин. Идентификацию хроматографических пиков бетулина и бетулиновой кислоты производят по времени удерживания [11].

1.3. Обзор литературных данных по окислению бетулина

Бетулиновая кислота представляет интерес для медицины и фармации как анти-ВИЧ-1 и противоопухолевое действующее вещество, а ее производные обладают антиоксидантным, иммуностимулирующим, противоязвенным и гепатопротекторным действиями [2]. Бетулиновая кислота является природным биологическим активным веществом, содержащимся в коре и листьях многих растений, но ее выделение из них не перспективно из-за малого содержания (около 0,1% от массы сухого сырья) [21].

Литературные данные [22] показывают, что синтез бетулоновой, а затем и бетулиновой кислот из бетулина – наиболее ценного продукта переработки коры берез *Betula* (бересты), который является тритерпеновым спиртом природного происхождения, можно проводить в различных экспериментальных условиях, как показано в таблице 1.3.1. Большинство известных способов являются достаточно трудоемкими, включают использование большого количества разных видов органических растворителей, характеризуются длительностью отдельных стадий и относительно невысоким выходом бетулиновой кислоты по отношению к бетулину [23].

Разные методы окисления бетулина встречающиеся в литературных источниках

№	Исходное вещество	Реагент окисления	Условия реакции (выход)
1	Бетулин	Реактив Джонса	Ацетон (92%)
			Ацетон, 1 ч, 25 °С (52%)
			Ацетон, 1,5 ч, 0 °С (67%)
			Ацетон, 7 ч, 0-5 °С (85%)
			Ацетон, 36 ч, ком. t (90%)
			ДМФ(диметилфталат), ком.t (83%)
2		2-Йодоксибензойная кислота	Тetraгидрофуран и диметилсульфоксид, 2 ч, 23 °С (90%)
3		Реактив Десс-Мартина Хлорпиридиновый хромат $((C_5H_5NH)^+ CrO_3^-)$	CH ₂ Cl ₂ , 4 ч, ком.t, (83%)
4			CHCl ₃ 2 ч, 20 °С (93%)
5	3-диоксибетулиновая кислота	Пиридиновый дихромат $((C_5H_5NH)_2 Cr_2O_7^{2-})$	Диметилфталат, 2ч, ком.t, (87%)
6	а) Бетулин	а) Йодоксибензойная кислота	а) Tetрагидрофуран, 1 ч, 70 °С (95%)
	б) Бетулинал	б) Перманганат тетрабутиламмония	б) Пиридин-толуол (95%)

1.3.1. Катализаторы окисления

Для превращения бетулина в бетулоновую кислоту в литературных источниках предложено использовать несколько окислителей: азотную кислоту, перманганат калия, хромовую кислоту и её производные и другие окислители (рис. 1.3.1). Хороших результатов добиваются в случае окисления бетулина оксидом хрома (VI) в различных растворителях [24].

Наиболее удобным методом является прибавление водного раствора серной кислоты, содержащего оксид хрома (VI), (известного как реактив Джонса), к ацетоновому раствору соединения, подлежащего окислению [24].

Выход целевого продукта напрямую зависит от условий реакции времени, температуры и количества окислителя.

Бетулиновую кислоту синтезировали из бетулина в две стадии. На первой стадии бетулин окисляют в бетулоновую кислоту, а на второй стадии восстанавливают кето-группу бетулоновой кислоты боргидридом натрия [25].

Основные проблемы окисления бетулина обусловлены, во-первых, неселективностью процесса, из-за содержания в молекуле трех активных центров: первичный (C-28) и вторичный (C-3) спиртовые группы и изопрופןильный фрагмент. Во-вторых, трудно регулировать диапазон продуктов окисления, ими могут быть альдегиды или кетоны, а также кислоты. В-третьих, лабильность структуры бетулина обеспечивает условия для различных перестроек с учетом эффекта избыточной концентрации [26].

1.3.1.1. Окисление бетулина до бетулоновой кислоты реактивом Джонса

Наиболее распространенным и хорошо изученным методом, является окисление бетулина оксидом хрома (VI) в водном растворе соляной кислоты (реактив Джонса), который прибавляется к ацетоновому раствору соединения [24]. Однако при отклонении от оптимальных условий окисление бетулина сопровождается рядом побочных реакций, которые конкурируют с основным процессом, и это существенно снижает выход целевого продукта [27].

Установлено, что на выход бетулоновой кислоты, существенно влияют следующие факторы: время окисления и соотношение бетулина и оксида хрома (VI). Изменение времени реакции, от одного до четырех часов, с фиксированным соотношением реагентов (на 1 моль бетулина использовали 3 моля CrO_3 в виде стандартного реактива Джонса) и постоянной температурой реакции (0°C), приводит к увеличению выхода бетулоновой кислоты с 15,4 до 54,5%. Последующее увеличение времени окисления вызывает резкое

снижение выхода бетулоновой кислоты. Увеличение количества оксида хрома (VI) от одного до семи молей на моль бетулина увеличивает выход бетулоновой кислоты от 17,5 до 55,0%, время окисления уменьшается от 4 до 0,5 ч соответственно [28, 29].

Долговременность и многостадийность процесса очистки, которая включает колоночную хроматографию, перекристаллизацию и экстракцию с использованием очень больших объемов растворителей, что делает его непригодным для широкомасштабного промышленного применения – основные отрицательные стороны данного метода [30, 31].

1.3.1.2. Окисление бетулина $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$ в водно-ацетоновой среде на твердых сорбентах кислотного характера

Бетулин окисляли $K_2Cr_2O_7$ в водно-ацетоновой среде на силикагеле при комнатной температуре 30 минут, в результате образуется единственный продукт – бетулоновый альдегид при высокой конверсии бетулина [32].

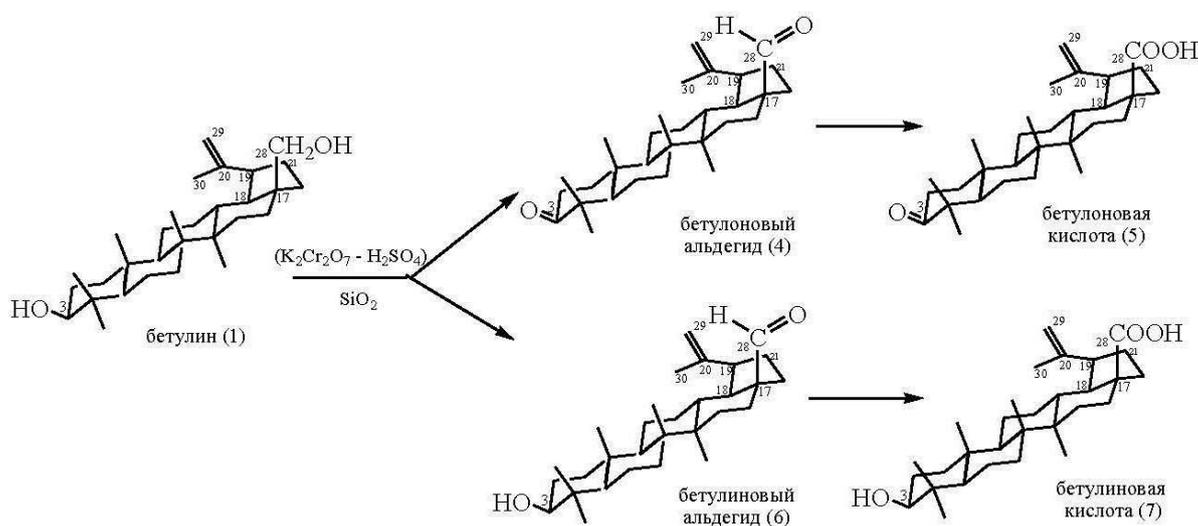


Рис. 1.3.2. Окисление бетулина $K_2Cr_2O_7$ в водно-ацетоновой среде на силикагеле.

Проведение окисления в данных условиях, но при изменении температуры до 0 °С приводит к резкому ускорению процесса: через 2-3 мин

конверсия бетулина достигает 100%, продукты реакции – бетулиновый и бетулоновый альдегиды при массовом соотношении 5:95 (рис. 1.3.2) [33].

Содержание бетулонового альдегида практически неизменно при увеличении времени реакции до 1 ч (таблица 1.3.2) [34].

К высокой селективности ведет применение твердой подложки, содержащей цеолиты (M_xO , Al_2O_3 , $ySiO_2$, zH_2O), так же высокую селективность окисления обуславливают ионы Al^{3+} , в его составе. Основным продуктом реакции (ИК – и ЯМР – спектры, ВЭЖХ) является бетулоновый альдегид [35].

Таблица 1.3.2.

Окисление бетулина $K_2Cr_2O_7$ в водно-ацетоновой среде на силикагеле в течение 1-160 мин при $0^\circ C$ (ВЭЖХ – мониторинг)

№ примера	Время реакции, мин	Конверсия бетулина, %	Продукты, масс. %		
			Бетулоновый альдегид	Бетулиновый альдегид	Бетулоновая/ Бетулиновая кислоты
1	2	98	95	5	–
2	5	100	93	7	–
3	10	100	93	4	0 / 3
4	20	100	93	4	0 / 3
5	65	100	93	4	0 / 3
6	80	100	85	4	8 / 3
7	160	100	70	-	20 / 10

Основными продуктами реакции окисления бетулина на гранулах Al_2O_3 являются бетулоновой альдегид и бетулоновая кислота [36]. В качестве незначительных примесей в смеси содержится бетулиновый альдегид и бетулиновая кислота. Можно предположить, что окисление бетулина в данном случае, протекает в две стадии. На первой стадии происходит образование бетулонового альдегида, с последующим окислением до бетулоновой кислоты. Использование метода ВЭЖХ при низкой температуре позволяет фиксировать динамику образования бетулонового альдегида и бетулоновой кислоты (рис. 1.3.3) [37].

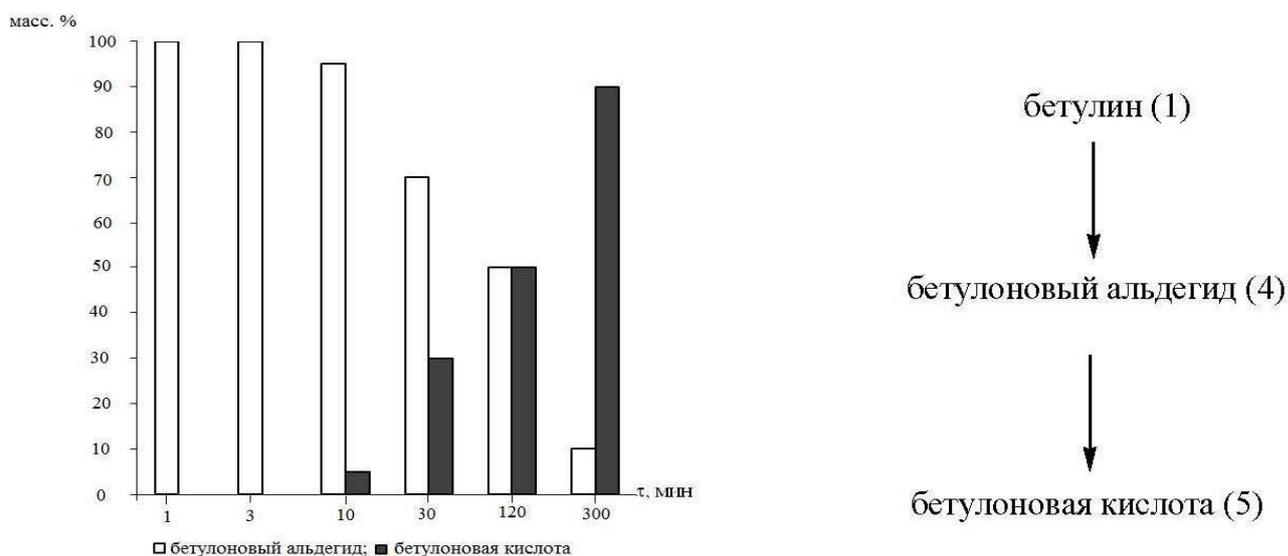


Рис. 1.3.3. Динамика образования бетулонового альдегида и бетулоновой кислоты в реакционной смеси при окисления бетулина $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$ в водно-ацетоновой среде в присутствии Al_2O_3 при $0\text{ }^\circ C$.

При сравнении результатов окисления бетулина на гранулах оксида алюминия, силикагеле и цеолитах, подтверждает стабилизирующее влияние SiO_2 на окисление бетулина до альдегидов и усиление глубины окисления до бетулоновой кислоты с использованием ионов Al^{3+} [38].

Образование единственного продукта – бетулоной кислоты при 100% конверсии бетулина достигается при соблюдении условий окисления: соотношение окислителя к бетулину 3:1, соотношение твердой подложки к бетулину 6:1. Гранулы Al_2O_3 с плотно прилипшим слоем зеленого цвета, отделенные декантированием, подвергаются регенерации. Прибавление воды к гранулам Al_2O_3 после реакции приводило к образованию раствора $Cr_2(SO_4)_3$, не содержащего органической компоненты. Такой способ позволяет отделить соединения Cr (III) и регенерировать в дальнейшем гранулы Al_2O_3 [39].

1.4. Катализаторы восстановления

Для перевода бетулоновой кислоты, находящейся в органической фазе, в бетулиновую можно использовать в качестве восстановителя боргидрид натрия – в водной, системе органический растворитель-вода. В качестве органической фазы могут быть использованы: хлористый метилен, дихлорэтан, толуол, бензол. Катализаторами межфазного переноса (КМФП) могут быть: триэтилбензиламмонийхлорид (ТЭБАХ), тетрабутиламмонийбромид (ТБАБ), тетрабутиламмониййодид (ТБАИ) и N-1-адамантилпиридинийбромид [40].

Реакция восстановления протекает при комнатной температуре. Мольное соотношение бетулоновой кислоты и боргидрида натрия, количество боргидрида натрия в водной фазе, концентрация катализатора межфазного переноса может варьировать. В колбу объемом 50 мл, с магнитной мешалкой, прибавляется 0,25 г (0,55 ммоль) бетулоновой кислоты, 10 мл органического растворителя, приливается раствор боргидрида натрия в воде, затем добавляют катализатор межфазного переноса. На 1 ммоль восстановителя используется 0,5 ммоль МФК. Восстановление проводится в течение 2 ч при комнатной температуре при интенсивном перемешивании, условия сохраняются при измене катализаторов. По истечении двух часов, в колбу добавляется 10 мл 5% раствора соляной кислоты для разложения остатков боргидрида натрия. После окончания разложения продукт реакции экстрагируется эфиром. Эфирный экстракт промывается водой, содой, затем снова водой, сушится над сульфатом натрия. Эфир отгоняется. Остаток после отгонки эфира анализируется методами ИК- и ПМР-спектроскопии [41, 42].

Контроль процесса восстановления осуществляется методом ТСХ на пластинках «Silyfol» с использованием растворителей хлороформ – метанол – муравьиная кислота. ИК-спектры записываются на приборе «Vektor»-22 в KBr, спектры ПМР – на приборе «Avance 200» (BRUKER) с рабочей частотой 200 МГц в $CDCl_3$ [41].

Количество непрореагировавшей бетулоновой кислоты определяется анализом ИК-спектров продуктов реакции, методом «базовой линии» [43]. Для количественных измерений выбрана полоса поглощения при 1705 см^{-1} , которая соответствует валентным колебаниям кето-группы бетулоновой кислоты. В ИК-спектрах серии проб с различной концентрацией бетулоновой кислоты, шагом $0,5\text{ мг}$ измеряли пропускание (в %) у базовой линии и в минимуме полосы. На основании полученных данных строится калибровочный график зависимости поглощения от концентрации бетулоновой кислоты, по которому определяется количество бетулоновой кислоты в рабочих образцах [44].

Более продуктивными межфазными катализаторами в реакциях восстановления бетулоновой кислоты боргидридом натрия по схеме (рис. 1.4.1) являются ТЭБАХ и ТБАБ. С применением данных катализаторов восстановление протекает за 2 ч на 98,5–99,3%. Полоса поглощения при 1705 см^{-1} в ИК-спектрах этих образцов отсутствует. Конечным продуктом является практически чистая бетулиновая кислота, что подтверждается анализом их ПМР-спектров. В спектре ПМР проявляется протон при $\text{C}3$: (CDCl_3) (δ), (м.д.) 3,44 (трипл. 1Н, 3Н α -гидрокси-изомер) 3,22 (дубл. дубл. 1Н, 3Н β -гидрокси-изомер) [45].

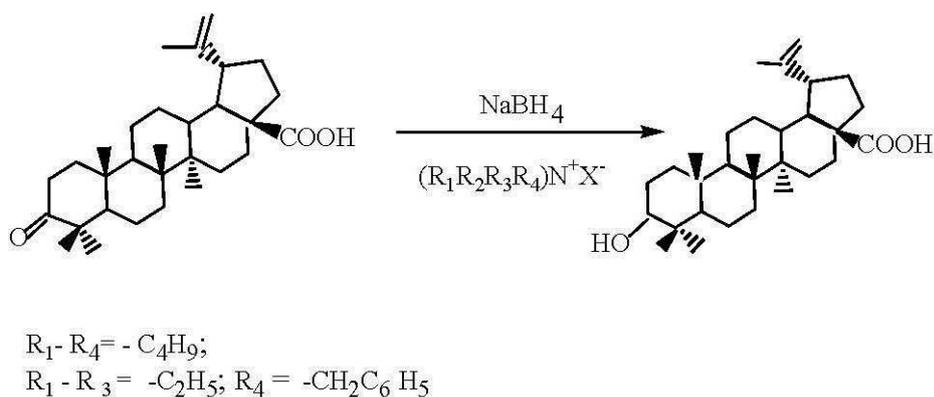


Рис. 1.4.1. Схема восстановления бетулоновой кислоты боргидридом натрия.

Менее эффективным катализатором является N-1-адамантилпиридиний бромид. Так, в системе бензол–вода за 2 ч бетулоновая кислота восстанавливается только на 59,4%. Тетрабутиламмонийиодид в хлорсодержащих органических растворителях большей частью переходит в

органическую фазу без обмена иодид-иона на боргидрид-ион (в органической фазе обнаружено присутствие иодид-ионов) [42].

Литературные данные [46] показывают, что степень конверсии бетулоновой кислоты зависит от природы органического растворителя. Наилучшие результаты получены при использовании бензола в качестве органической фазы. Практически полное восстановление бетулоновой кислоты достигается в системах бензол–вода–ТЭБАХ и бензол–вода–ТБАБ. И только 77,4% бетулоновой кислоты восстанавливается за 2 ч в толуоле при использовании в качестве катализатора ТБАБ.

Реакции восстановления протекают медленнее в хлорсодержащих органических растворителях – дихлорметане и 1,2-дихлорэтаноле, независимо от вида используемого катализатора. Степень превращения бетулоновой кислоты в дихлорметане составила 69,2%, а в 1,2-дихлорэтаноле – 78,3% (катализатор ТБАБ) за 2 ч (таблица 1.4.1) [46].

На скорость восстановления существенно влияет концентрация боргидрида натрия в водной фазе. Бетулоновая кислота восстанавливается на 98,5–97,3% за 2 ч в системах бензол–вода–ТЭБАХ и бензол–вода–ТБАБ при концентрации боргидрида 1,5%. При меньших концентрациях скорость восстановления уменьшается. При концентрации боргидрида натрия 0,5% бетулоновая кислота восстанавливается на 41,7% за 2 ч в системе бензол–вода–ТБАБ (рис. 1.4.2) [47].

Для достижения высокой эффективности процесса восстановления требуется использование большего количества катализатора, чем принято в практике межфазного катализа [41]. Оптимальное мольное соотношение восстановитель – катализатор составляет 4:1. При меньших значениях мольных соотношений восстановитель – катализатор эффективность восстановления падает [48].

Снижение расхода боргидрида натрия до 2 молей на 1 моль бетулоновой кислоты и сокращение времени процесса до 2 ч, стало возможным благодаря

использованию межфазных катализаторов в реакции восстановления бетулоновой кислоты в бетулиновую кислоту [42].

Таблица 1.4.1.

Степень превращения бетулоновой кислоты в различных растворителях в условиях межфазного катализа

Катализатор	Степень превращения бетулоновой кислоты в различных растворителях, %			
	бензол	1,2-дихлорэтан	дихлорметан	толуол
ТЭБАХ	98,5	75,3	68,1	74,6
ТБАБ	99,3	78,3	69,2	77,4
N-1-адамантилпиридиний бромид	59,4	48,3	-	-

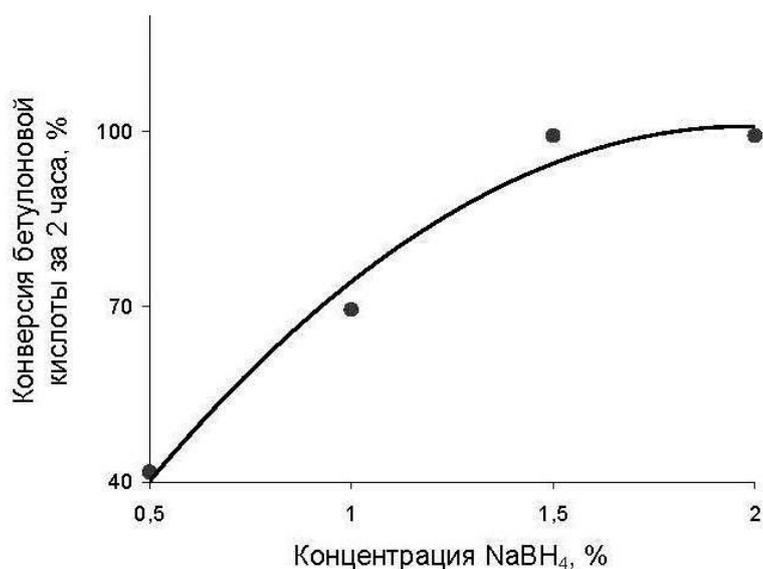


Рис. 1.4.2. Влияние концентрации NaBH₄ в водной фазе на степень восстановления бетулоновой кислоты в системе бензол–вода–ТБАБ.

II ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Определение концентрации бетулина и продуктов его окисления/восстановления

2.1.1. Оборудование, реактивы, материалы

- жидкостной хроматограф «Agilent 1100» с диодно-матричным детектором («Agilent», Хьюлет Паккард, Германия)
- хроматографическая колонка ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6x250mm (США);
- жидкостной хроматограф «Миличром А-02» с УФ-детектором (ЗАО «Институт хроматографии ЭКОНОВА», Россия);
- колонка ProntoSIL – C₁₈AQ, 5 мкм, 2,0 x 75 мм, ЧТТ – 5181 (бенз(а)пирен);
- ИК-спектрометр NICOLET iS10;
- ИК-фурье спектрометр ФСМ 1201(ООО «МОНИТОРИНГ»);
- ротационный испаритель (LABTEX);
- весы лабораторные ВЛР-200, 2 класса точности, ГОСТ 24104;
- компрессор воздушный KB-1;
- водоструйный насос вакуумный, ГОСТ 10696- 75;
- фильтры мембранные фторопластовые МФФК – 3Г 0,45 мкм, 50 мм, ТУ 6-55-221-1323-93;
- виалы, ГОСТ 25336—82;
- бюксы, ГОСТ 25336—82;
- термостойкая посуда, ГОСТ 25336—82;
- фильтры Шотта ГОСТ 25336—82;
- образцы бетулина (6 проб);
- бихромат калия K₂Cr₂O₇, ГОСТ 2652-78;
- хромат калия (калий хромово кислый) K₂CrO₄, ГОСТ 4459-75;

- оксид хрома (VI) CrO_3 , ГОСТ 3776-78;
- оксид алюминия (глинозем) Al_2O_3 , ГОСТ 30558-98;
- силикагель MN Kieselgel 60;
- боргидрид натрия NaBH_4 , ГОСТ 246-76;
- серная кислота H_2SO_4 , ГОСТ 4204-77;
- соляная кислота HCl , ГОСТ 3118-77;
- азотная кислота HNO_3 , ГОСТ 4461-77;
- уксусная кислота CH_3COOH , ГОСТ 61-75;
- изопропиловый спирт (пропанол-2) $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, ГОСТ 9805-84;
- 1,4-диоксан (диэтилендиоксид) $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, ГОСТ 10455-80;
- этиловый спирт $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, ГОСТ Р 51652-2000;
- бензол C_6H_6 , ГОСТ 5955-75;
- 10% раствор KOH ;
- вода бидистиллированная (очищенная с KMnO_4), ГОСТ 6709-72;
- ацетонитрил, сорт 1, о.с.ч.; ТУ 6-09-3534-74;
- ацетон, о.с.ч., ТУ 2633-039-44493179-00;
- 1,0% трифторуксусная кислота;
- герметичные вials объемом 2 см³ и 250 мкл.

2.1.2. Подготовка к выполнению измерений

2.1.2.1. Условия хроматографирования (ДМ- детектор) «Agilent 1100»

- Состав элюента: А – 25% ацетонитрил, В – 75% вода;
- изократический режим;
- скорость элюирования – 0,5 мл /мин;
- объем вводимой пробы – 1 мкл;
- температура термостата – 30 °С;
- длины волн детектирования – 280 нм.

2.1.2.2. Условия хроматографирования (УФ- детектор)

«Милихром А – 02»

- Состав элюента: А – 70% вода, В – 25% ацетонитрил, С – 5% модификатор (1,0% трифторуксусная кислота);
- градиентный режим: линейное повышение концентрации элюента В с 25% до 70% за 15 минут, линейное понижение концентрации элюента А с 70% до 25% за 15 минут;
- скорость элюирования – 1,0 мл /мин;
- объем вводимой пробы – 50 мкл;
- температура термостата – 35 °С;
- длины волн детектирования – 280 нм.

2.2. Окислительные смеси

Приготовление реактива Джонса:

в колбу объемом 250 мл наливают 154 мл дистиллированной воды, добавляют 14 мл концентрированной серной кислоты и 53,6 г оксида хрома (VI) и тщательно перемешивают. Реактив Джонса хранят при комнатной температуре.

Приготовление раствора уксусной кислоты:

для приготовления 10% раствора уксусной кислоты, разбавляем в 10 раз ледяную уксусную кислоту.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Обработка методики анализа бетулина методом ВЭЖХ

3.1.1. Определение оптимальных режимов эффективного разделения бетулина методом ВЭЖХ

Раствор бетулина объемом 5 мкл (5 мг в смеси растворителей ацетон/ацетонитрил (2:3)) вводили в хроматографическую колонку и анализировали в режиме изократического элюирования («Agilent 1100»). На хроматограмме регистрировались пики. Анализ литературных данных показал, что максимальная площадь соответствует бетулину. В качестве примесей идентифицированы лупеол и бетулиновая кислота (рис. 3.1.1). Идентификацию примесей проводили путем сравнения хроматограмм, полученных в нашей лаборатории и в приведенных хроматограмм в работах [6, 11] (на аналогичных колонках и схожих составов подвижных фаз).

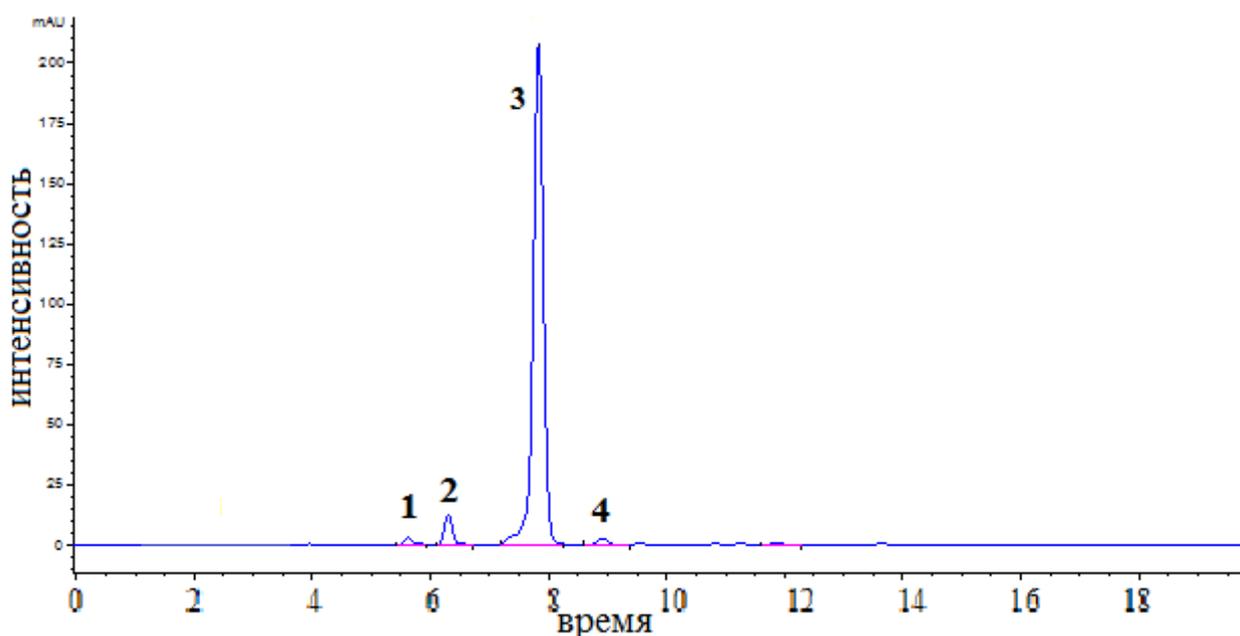


Рис. 3.1.1. Хроматограмма бетулина (5 мг/мл в ПФ (смесь ацетон-ацетонитрил), ВЭЖХ система «Agilent 1100», ДМД, $\lambda=280$ нм). 1 – лупеол, 2 – бетулиновая кислота, 3 – бетулин, 4 – не идентифицированное вещество.

В таблице 3.1.1. сведены результаты анализа 6 проб бетулина, полученных разными способами на предприятии ООО «СБК» (г. Тюмень)¹. Концентрации компонентов рассчитывали методом нормализации.

Таблица 3.1.1.

Процентное содержание бетулина в исследуемых образцах
(метод нормализации, n=2)

№	Внешний вид	Концентрация бетулина % масс. отн.		
		X ₁	X ₂	X _{ср.}
1	мелкий порошок, желтоватого цвета	82,1	79,8	81,0
2	мелкий порошок, серовато-желтого цвета	60,4	60,2	60,3
3	мелкий порошок, серовато-белого цвета	48,7	48,6	48,7
4	мелкий порошок, белого цвета	84,7	83,2	85,0
5	мелкий порошок, серовато-желтого цвета	88,9	88,8	88,9
6	мелкий порошок, белого цвета	80	79,6	79,8

Аналогичные результаты были получены при анализе образцов на микроколоночном хроматографе (Милихром А-02). Для предприятия ООО «СБК» рекомендован этот прибор для контроля качества бетулина (по отношению цена/качество).

В дальнейшем качественную идентификацию бетулина, продуктов его окисления и восстановления проводили по УФ- и по ИК-спектрам.

¹ Выражаем благодарность Сергею Шаврину, технологу компании «СБК» за предоставленные образцы бетулина.

3.1.2. Очистка технического бетулина методом колоночной хроматографии

Анализ литературных данных показал, что для перевода бетулина в бетулоновую кислоту используются различные окислители. В данном исследовании основной упор был направлен на оптимизацию процесса окисления.

Предварительно была предпринята попытка очистки бетулина методом колоночной хроматографии на силикагеле марки MN Kieselgel 60 фракции 0,04-0,063 мм. Для очистки брали 100 мг бетулина в результате хроматографирования подвижной фазой ацетон / ацетонитрил было получено 45 мг очищенного продукта. Хроматографический анализ очищенного бетулина выявил один хроматографический пик (рис. 3.1.2), электронный спектр очищенного бетулина представлен на рисунке 3.1.3.

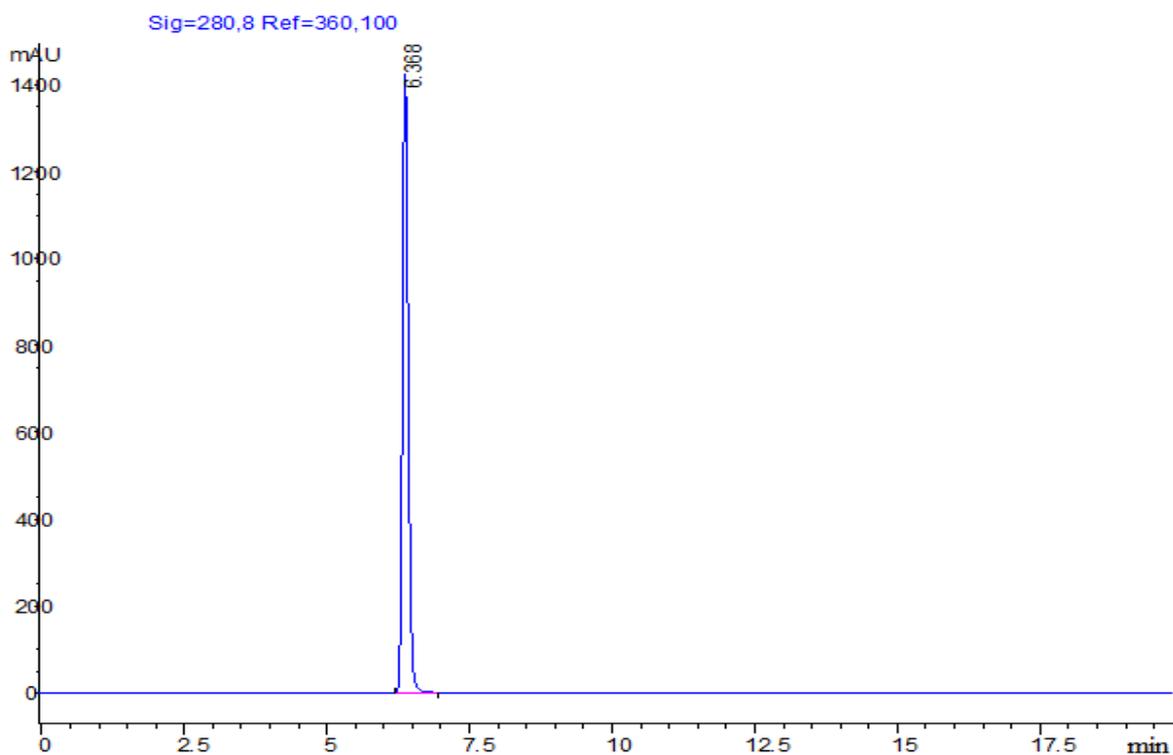


Рис. 3.1.2. Хроматограмма очищенного бетулина (5 мг/мл в ПФ (смесь ацетон-ацетонитрил), ВЭЖХ система «Agilent 1100», ДМД, $\lambda=280$ нм).

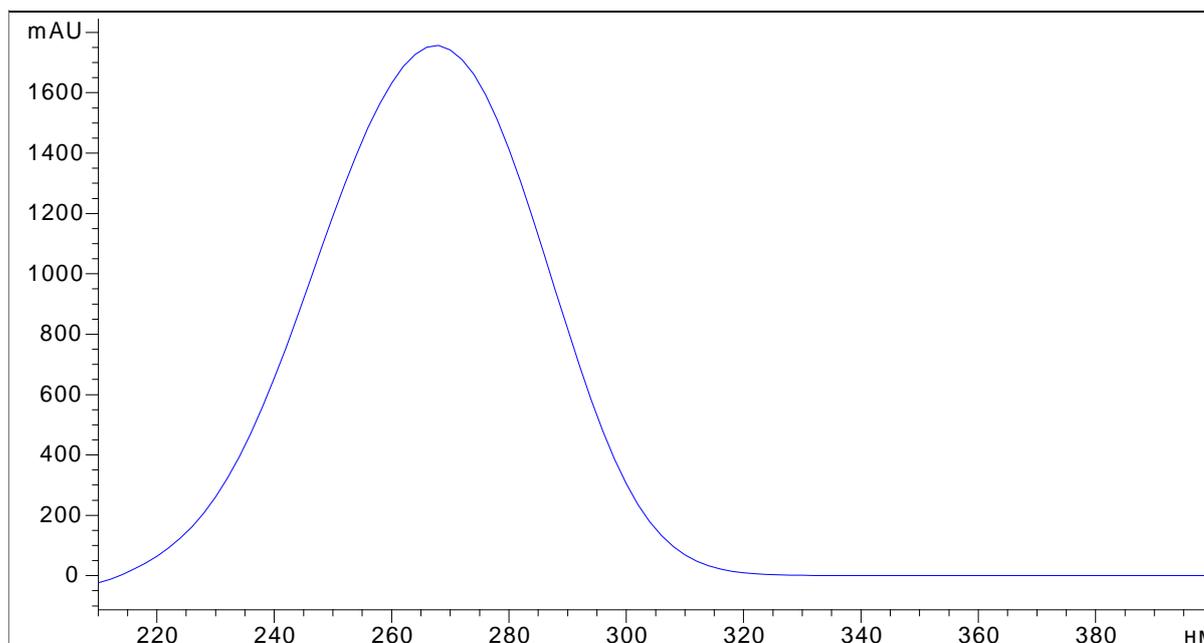


Рис. 3.1.3. Электронный спектр очищенного бетулина со временем удерживания 6,368 мин (рис. 3.1.2).

Поскольку проводить предварительную очистку бетулина в промышленных масштабах не целесообразно, последующие эксперименты по окислению и восстановлению бетулина проводились с неочищенными продуктами.

3.1.3. Окисление бетулина

В качестве окислителей использовали: реактив Джонса (смесь CrO_3 и H_2SO_4), смеси $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7\text{-H}_2\text{SO}_4$ на Al_2O_3 , и $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7\text{-H}_2\text{SO}_4$ на SiO_2 .

Восстановление бетулоновой кислоты (бетулонового альдегида) до бетулиновой кислоты проводили боргидридом натрия (NaBH_4).

3.1.3.1. Окисление бетулина реактивом Джонса (Методика 1)

Первая методика – получение бетулоновой кислоты из экстракта бетулина (в нашем случае образца бетулина № 5). Воспользовались методикой, описанной в [24], загрузку уменьшали в 100 раз. К 1,00 г порошка бетулина прибавляли 30 мл ацетона, охлаждали полученный раствор до 5-10 °С и добавляли 1,30 мл свежеприготовленного реактива Джонса. Полученную смесь

перемешивали 3 ч при комнатной температуре (20-22 °С). После растворитель упаривали в вакууме, остаток разбавили 10 мл воды, образовавшийся осадок отфильтровывали на фильтре под вакуумом. Осадок промывали прохладной дистиллированной водой и сушили в шкафу при температуре 60 °С.

Выход продукта теоретически должен составлять 0,90 г неочищенной бетулоновой кислоты. Для очистки продукта окисления осадок растворили в 3,00 мл бензола, отфильтровали через слой окиси алюминия примерно в 5 мм и обрабатывали 10% раствором КОН до полного осаждения соли. Выделенный осадок – калиевая соль бетулоновой кислоты, промывали в 1,00 мл охлажденного бензола и сушили при комнатной температуре до постоянной массы. Калиевую соль бетулоновой кислоты растворяли в 3,00 мл этилового спирта. К полученному раствору добавляли в 10 мл 15%-го раствора HCl. Образовывался осадок – бетулоновая кислота. Осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали при 60 °С до постоянного веса. Выход продукта составил 0.17 г или 21% от теории.

ИК-спектр продукта окисления бетулина реактивом Джонса приведен на рисунке 3.1.4, а электронный спектр (фиксируемый методом ВЭЖХ) – на рисунке 3.1.5.

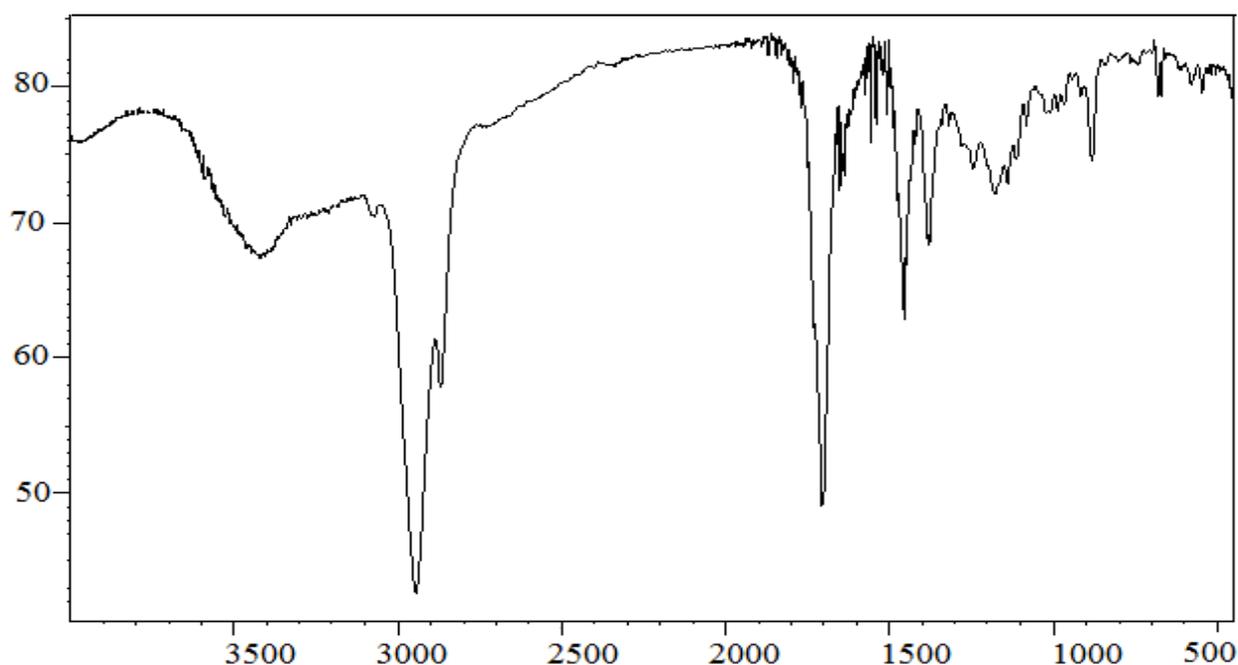


Рис. 3.1.4. ИК-спектр бетулоновой кислоты. Окислитель – реактив Джонса.

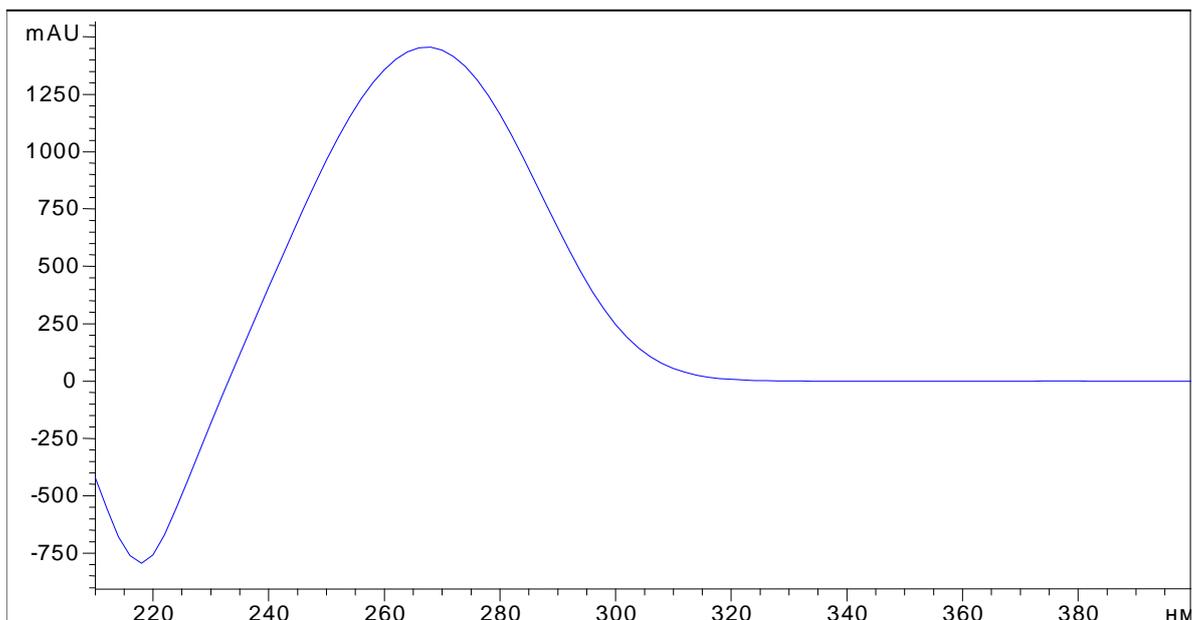


Рис. 3.1.5. Электронный спектр бетулоновой кислоты (Окислитель-реактив Джонса).

3.1.3.2. Окисление бетулина хромовым ангидридом в уксусной кислоте (методика 2)

1,5 г бетулина перемешивали с 60 мл ледяной уксусной кислоты и ставили на водяную баню, температура которой составляла 15-20 °С. К смеси, одной порцией, добавляли раствор 1,5 г CrO_3 в 2,6 мл уксусной кислоты и 2,2 мл воды при непрерывном смешивании и неизменной температуре. Бетулин полностью растворяется. Через 10 минут к полученной смеси добавляли 60 мл 10% раствора NaCl . Экстракцию продуктов реакции производили диэтиловым эфиром. Далее осуществляли промывку эфирного экстракта 10% NaCl . В полученную смесь добавляли 50 мл NaCl и 30 мл NaOH . В результате легкого встряхивания выпадает осадок на границе раздела фаз в виде хлопьев (натриевая соль бетулоновой кислоты). Через 1 ч удаляли водный слой, эфирный раствор сливали и к оставшемуся осадку в делительную воронку добавляли по 60 мл эфира и 10% NaCl , смесь тщательно встряхивали, до разделения эфирного и водного слоя, затем фильтровали. Полученные осадки соединяли и просушивали в вакууме вместе с пятиокисью фосфора. Полученные кристаллы растворяли в 40 мл метанола, с последующей

фильтрацией через слой силикагеля, чтобы удалить остаточные соединения хрома. Фильтрат упаривали. Получили натриевую соль бетулоновой кислоты. 10 мг натриевой соли смешивали в делительной воронке с 5 мл эфира и 2 мл соляной кислоты, встряхивали до полного растворения кристаллов, эфирный слой отделяли, промывали водой, сушили сульфатом натрия и упаривали. Остаток кристаллизовали из спирта. Получили белые кристаллы.

Выход составил менее 10%, поэтому ИК- и ВЭЖХ анализы продукта окисления бетулина хромовым ангидридом в уксусной кислоте не проводили.

3.1.3.3. Окисление бетулина до бетулоновой кислоты $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$ в присутствии Al_2O_3 в водно-ацетоновой среде (методика 3)

Следующий метод получения бетулина – окисление бетулина до бетулоновой кислоты в присутствии Al_2O_3 (9,2 г) [35] обрабатываются 3 г $K_2Cr_2O_7$, 20 мл воды и 5 мл H_2SO_4 последовательно. К 1,5 г порошка бетулина приливали 138 мл ацетона и помещали в ультразвуковую ванну на 30 мин для диспергирования. Затем к суспензии добавляли окислитель и перемешивали реакционную смесь в течение 1,5 ч. После осаждения неорганических соединений осадок декантировали. К фильтрату добавили 500 мл воды, что вызвало мгновенное появление осадка в виде белых хлопьев. Осадок отфильтровали на стеклянном фильтре (под вакуумом) и промывали несколько раз горячей дистиллированной водой. Полученный продукт высушили в сушильном шкафу до постоянной массы. Выход продукта составил 1.16 г или 77.33% от теории.

ИК-спектр продукта окисления бетулина реактивом Джонса приведен на рисунке 3.1.6, а электронный спектр (фиксируемый методом ВЭЖХ) – на рисунке 3.1.7.

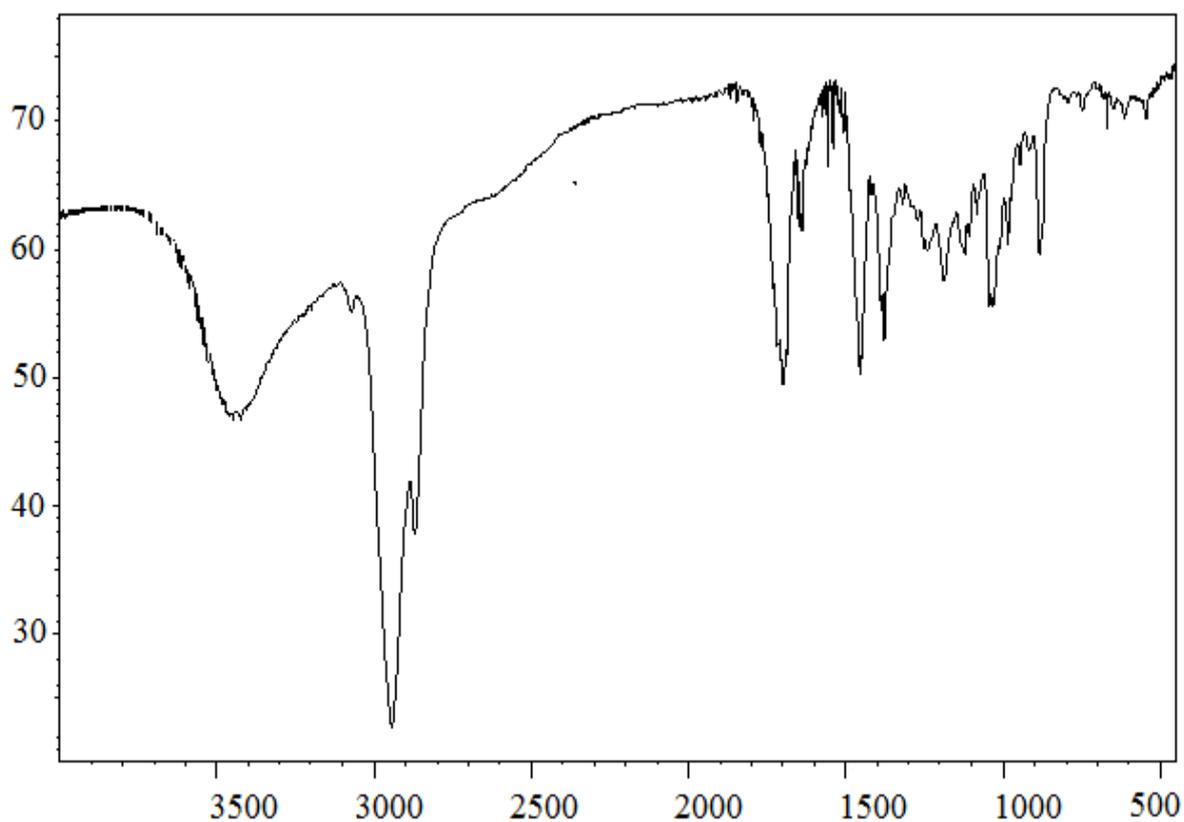


Рис. 3.1.6. ИК-спектр бетулоновой кислоты. Окислитель - $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$ на гранулах Al_2O_3 .

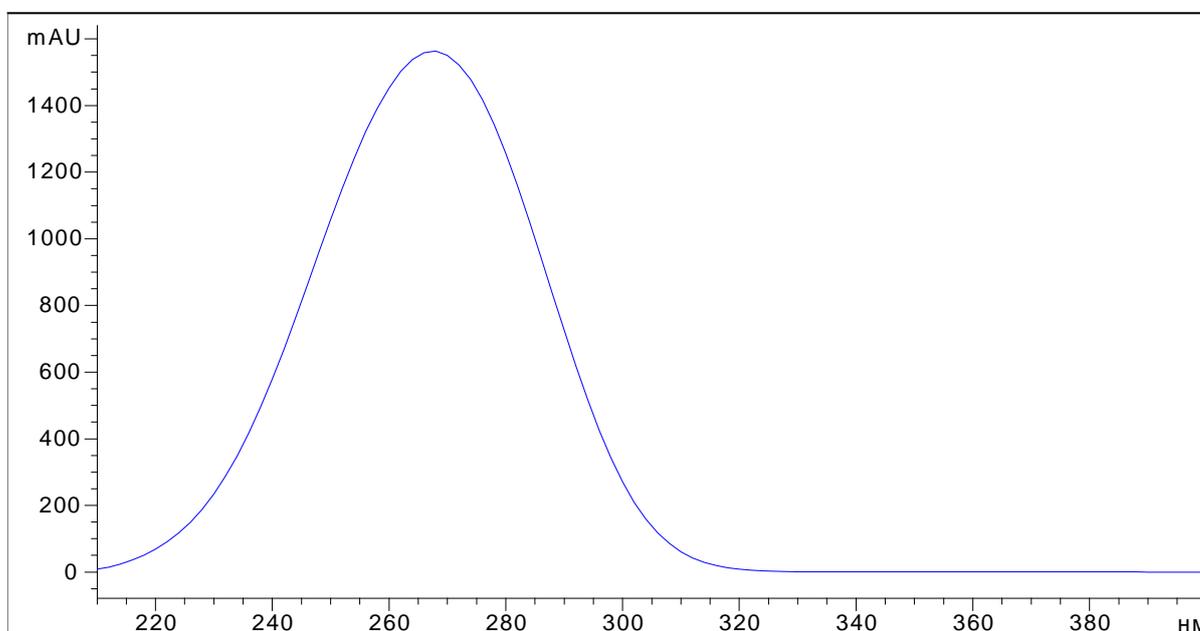


Рис. 3.1.7. Электронный спектр бетулоновой кислоты (окислитель - $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$ на гранулах Al_2O_3).

3.1.3.4. Окисление бетулина $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$ на силикагеле (методика 4)

Окисления бетулина проводили дихроматом калия в присутствии серной кислоты на силикагеле. Гранулы SiO_2 (10 г) [35], обработали последовательно $K_2Cr_2O_7$ в количестве 1,5 г, водой (40 мл) и H_2SO_4 (2,5 мл). Бетулин в количестве 1 г растворили в ацетоне. Полученный раствор диспергировали в ультразвуковой ванне 30 мин до получения светло-бежевой суспензии. Смесь-окислитель вносили в реакционную колбу с суспензией, перемешивали смесь 15 мин с помощью магнитной мешалки. Осадок с неорганическими веществами удаляли декантированием. К фильтрату добавляли к 500 мл прохладной дистиллированной воды. По описанной выше методике должны были выпасть кристаллы бетулоновой кислоты, но в нашем случае они не образовывались. Можно предположить, что существенное влияние на координацию бетулина относительно суспензии оксида кремния оказывает удельная поверхность и размеры пор последнего.

3.1.4. Восстановление бетулоновой кислоты боргидридом натрия [24]

Восстановление бетулоновой кислоты проводили при комнатной температуре 22 °С. К раствору 0,47 г (1 ммоль) бетулоново кислоты прибавляли 0,15 г (4 ммоль) боргидрида натрия, реакцию смесь перемешивали 1,5 ч. Для обработки раствора использовали 30 мл 10% раствора соляной кислоты, образовавшийся осадок бетулиновой кислоты отфильтровывали, промывали водой и сушили до постоянной массы.

ИК-спектр продукта восстановления бетулоновой кислоты боргидридом натрия в присутствии диоксана приведен на рисунке 3.1.8, а электронный спектр (фиксируемый методом ВЭЖХ) – на рисунке 3.1.

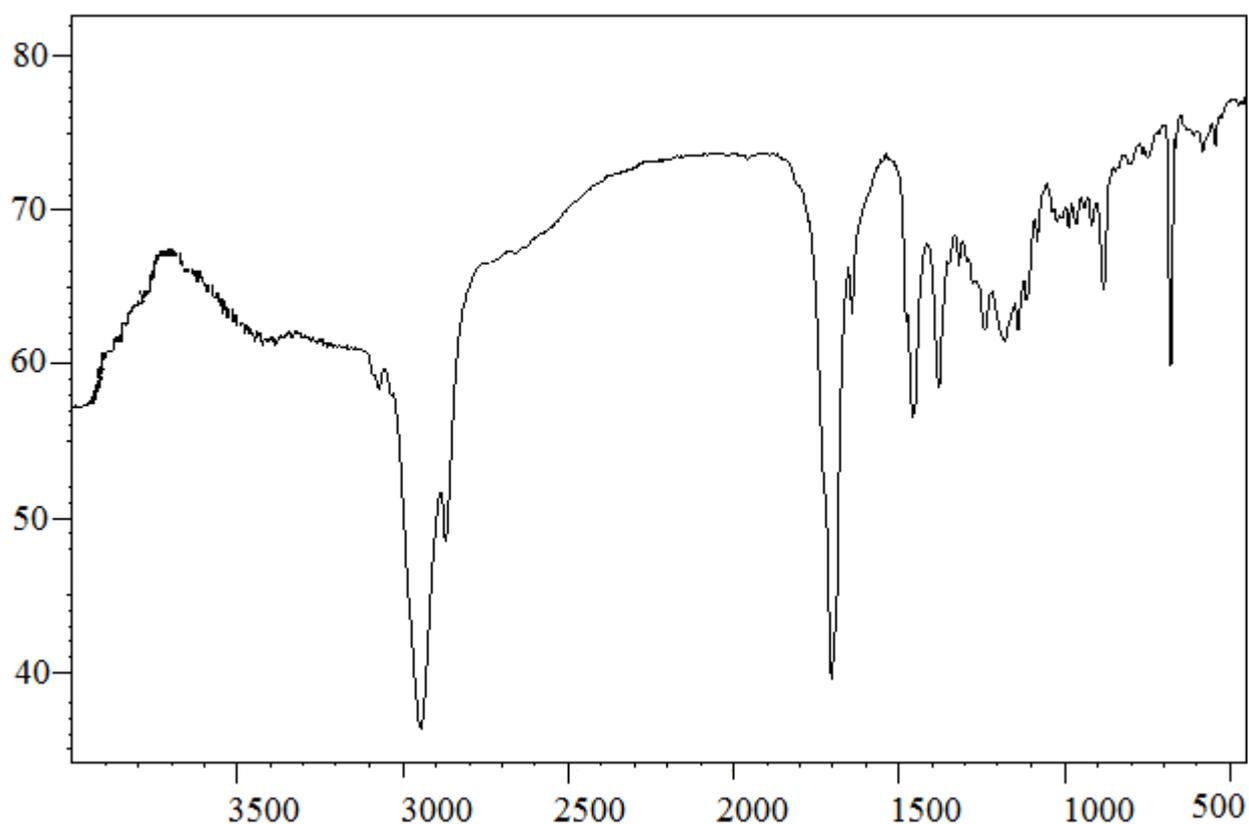


Рис 3.1.8 ИК-спектр бетулиновой кислоты

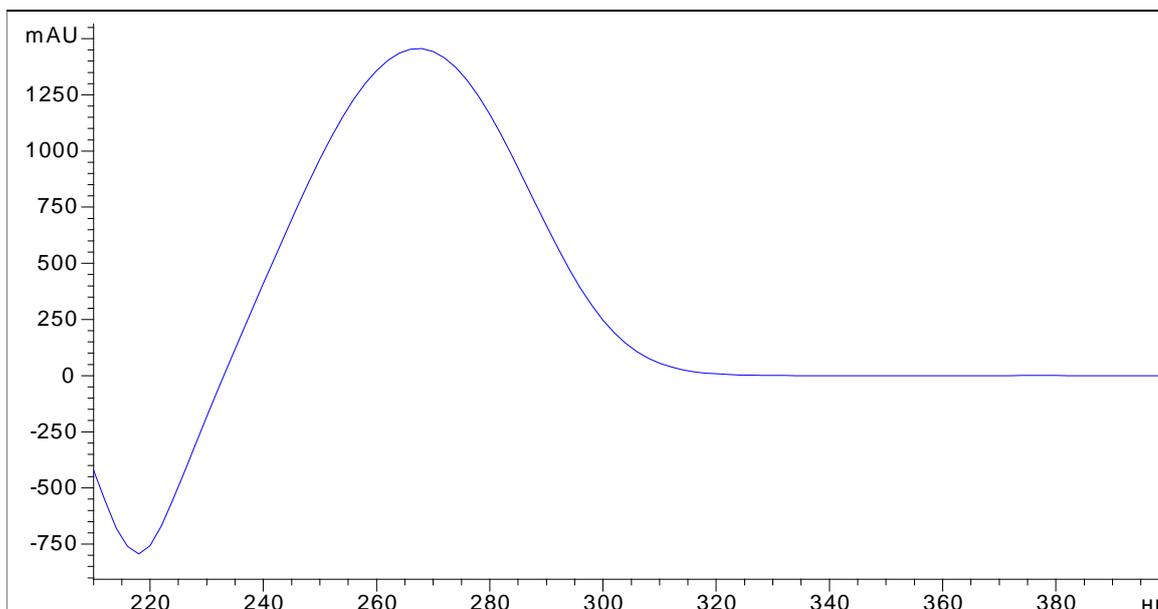


Рис. 3.1.9. Электронный спектр бетулиновой кислоты.

3.1.5. Качественное и количественное определение концентрации бетулоновой кислоты

Определение чистоты продуктов окисления бетулина проводили методом жидкостной хроматографии. Анализ проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1100 Series (США). Регистрацию компонентов осуществляли на диодно-матричном детекторе, длина волны 280 нм. Разделение проводили на хроматографической колонке ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6x250mm (США).

На рисунках 3.1.10 и 3.1.11 представлены хроматограммы бетулоновой кислоты, полученный по двум методикам 1 и 3. Как видно из рисунков на хроматограммах фиксируется только пик бетулоновой кислоты.

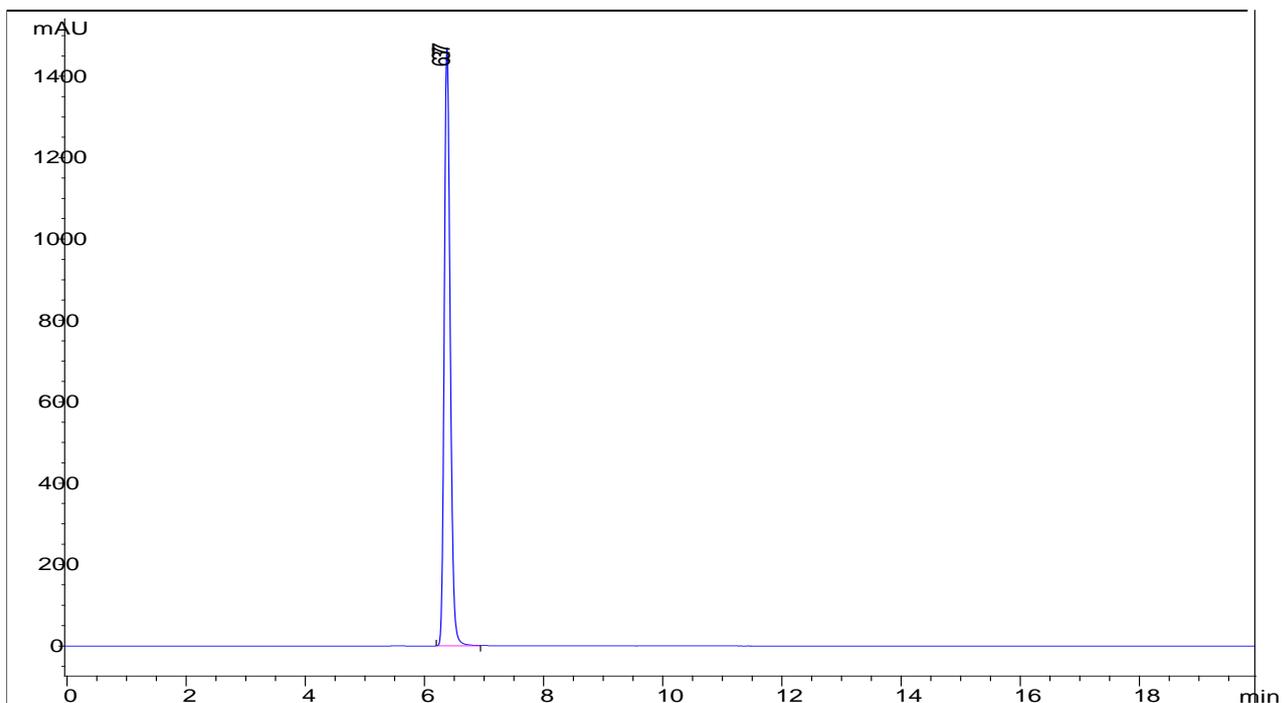


Рис. 3.1.10. Хроматограмма бетулоновой кислоты (5 мг/мл в ПФ (смесь ацетон-ацетонитрил)). Окислитель – реактив Джонса. ВЭЖХ система «Agilent 1100», ДМД, $\lambda=280$ нм).

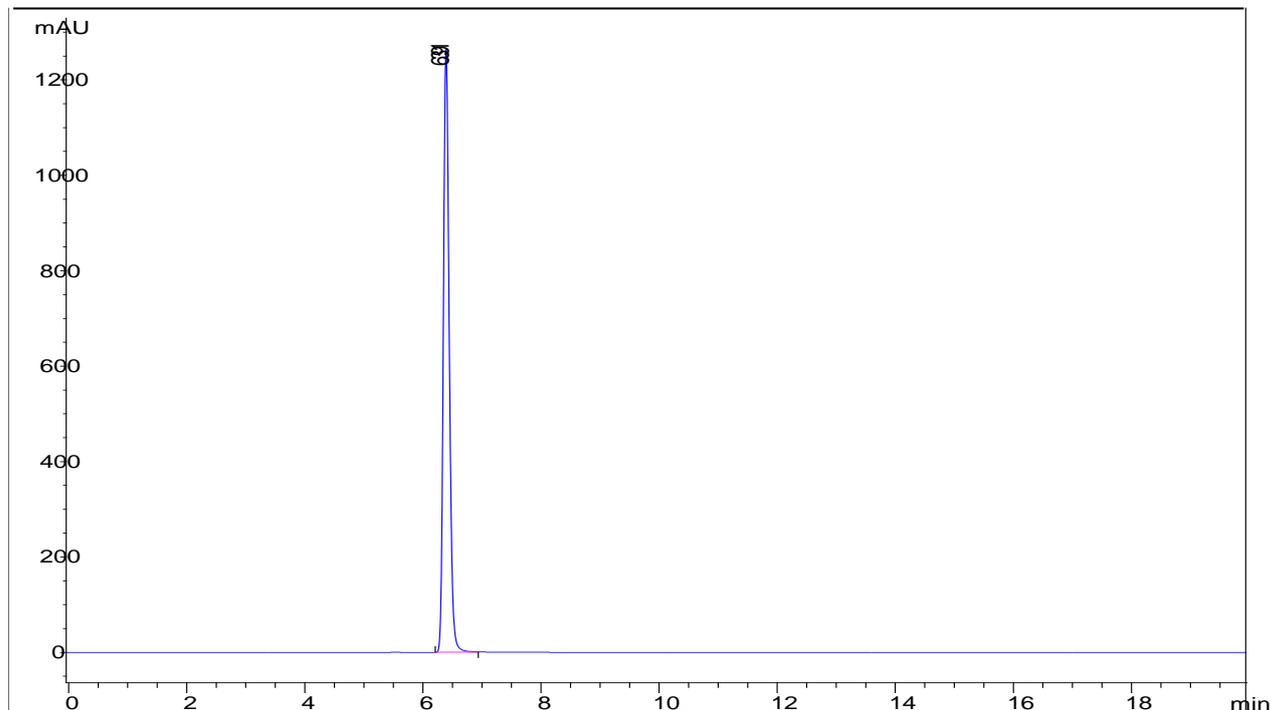


Рис. 3.1.11. Хроматограмма бетулоновой кислоты (5 мг/мл в ПФ (смесь ацетон-ацетонитрил)). Окислитель – $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$ на гранулах Al_2O_3 . ВЭЖХ система «Agilent 1100», ДМД, $\lambda=280$ нм).

Качественную идентификацию бетулоновой кислоты проводили по УФ-спектрам компонентов (рисунки 3.1.5; 3.1.7) и по ИК-спектрам компонентов (рисунки 3.1.4; 3.1.6).

Анализ УФ-спектров компонентов показал, что электронный спектр продукта окисления имеет максимум поглощения при 270 нм. В ИК-спектрах соединений интенсивно проявляются полосы для соответствующих групп в молекулах бетулоновой кислоты (рисунки 3.1.4; 3.1.6).

В работе [35] предложен механизм координации бетулина относительно частиц оксида алюминия (рисунок 3.1.12) и механизм реакции окисления в присутствии бихромата калия/серная кислота (рисунок 3.1.13). В результате образования аддукта между оксидом алюминия и окислителя (сложный эфир дихромата) образуется переходный комплекс между аддуктом и ОН-группами бетулина. Происходит процесс окисления и активный аква-комплекс оксида алюминия продолжает процесс окисления.

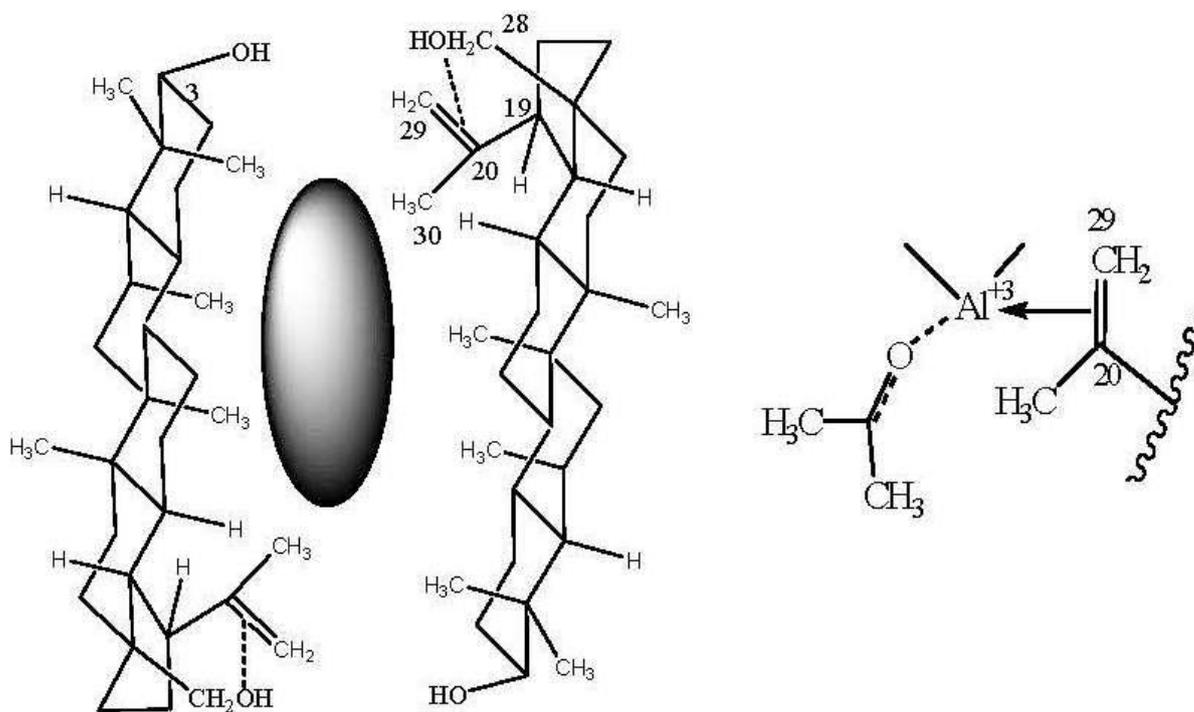


Рис. 3.1.12. Модель координации бетулина относительно твердого оксида алюминия [35].

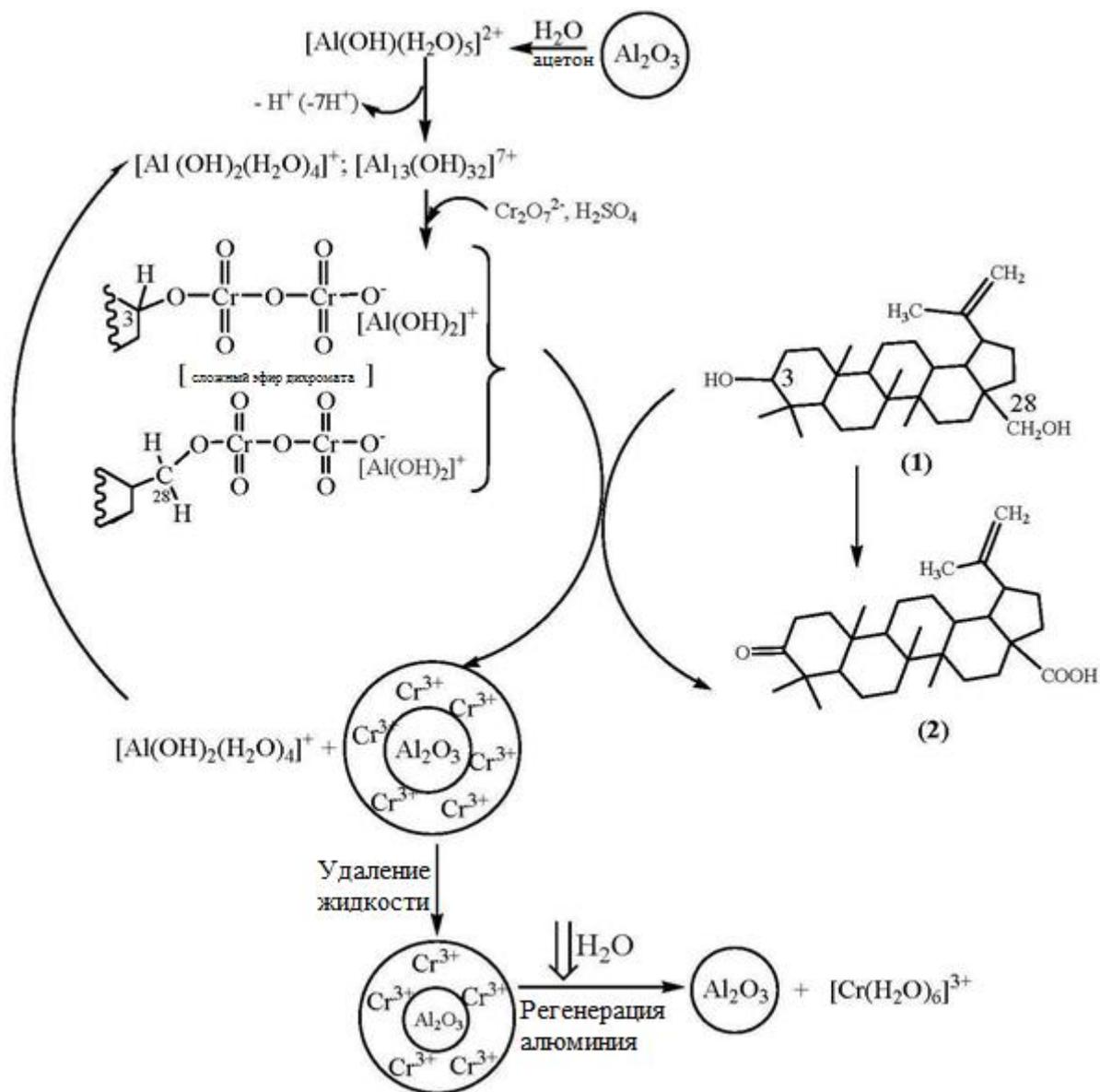


Рис. 3.1.13. Схема окисления бетулина в присутствии окислителя: бихромат калия/серная кислота [35].

3.1.6. Восстановление бетулоновой кислоты [24]

По процедуре, описанной в разделе 3.1.4, бетулоновую кислоту восстанавливают боргидридом натрия в среде диоксана. К (0,47 г (1ммоль) бетулоновой кислоты в 10 мл диоксана прибавляли 0,15 г (4ммоль) NaBH₄ и перемешивали 1,5 ч.). На рисунке 3.1.14 представлена схема реакции восстановления.

Попытка замены диоксана на изопропиловый спирт [24] не дала большего выхода продукта восстановления.

Очищенный продукт анализировали методом ВЭЖХ и ИК-спектроскопии. На рисунке 3.1.15 приведена хроматограмма бетулиновой кислоты. На ней фиксируется один пик, электронный спектр которого в максимуме хроматографического пика представлен на рисунке 3.1.9. Для удобства сравнения исходного и конечного продукта восстановления на рисунке 3.1.16 приведены ИК-спектры бетулоновой (зеленый спектр) и бетулиновой кислот (синий спектр).

В продукте восстановления появление ОН-группы в положении 3 проявляется в области 1500 см^{-1} .

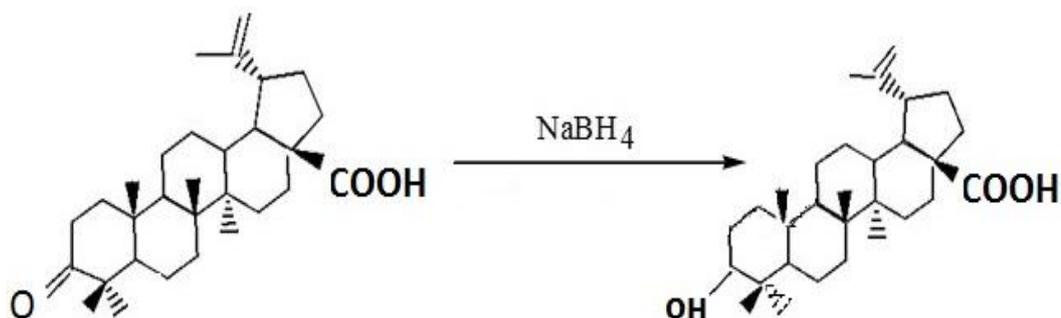


Рис. 3.1.14. Восстановление бетулоновой кислоты до бетулиновой кислоты боргидридом натрия.

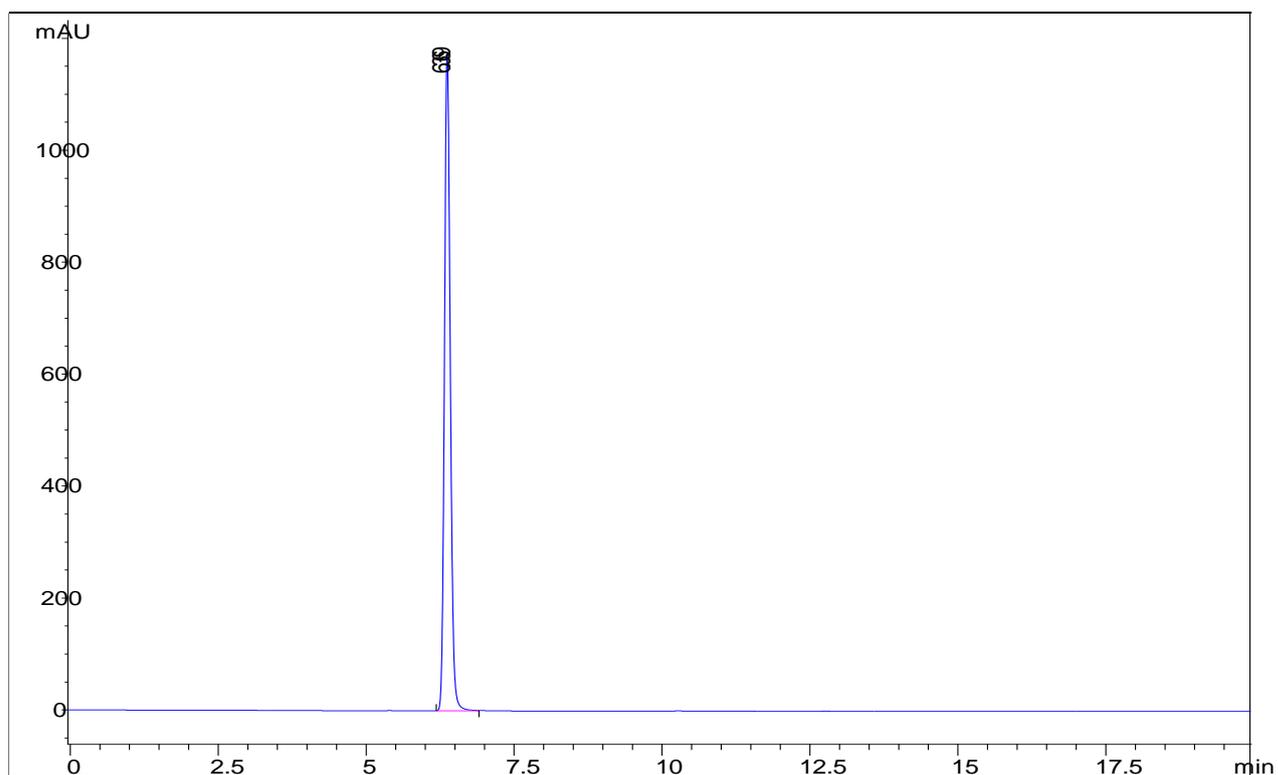


Рис. 3.1.15. Хроматограмма бетулиновой кислоты (5 мг/мл в ПФ (смесь ацетон-ацетонитрил), ВЭЖХ система «Agilent 1100», ДМД, $\lambda=280$ нм).

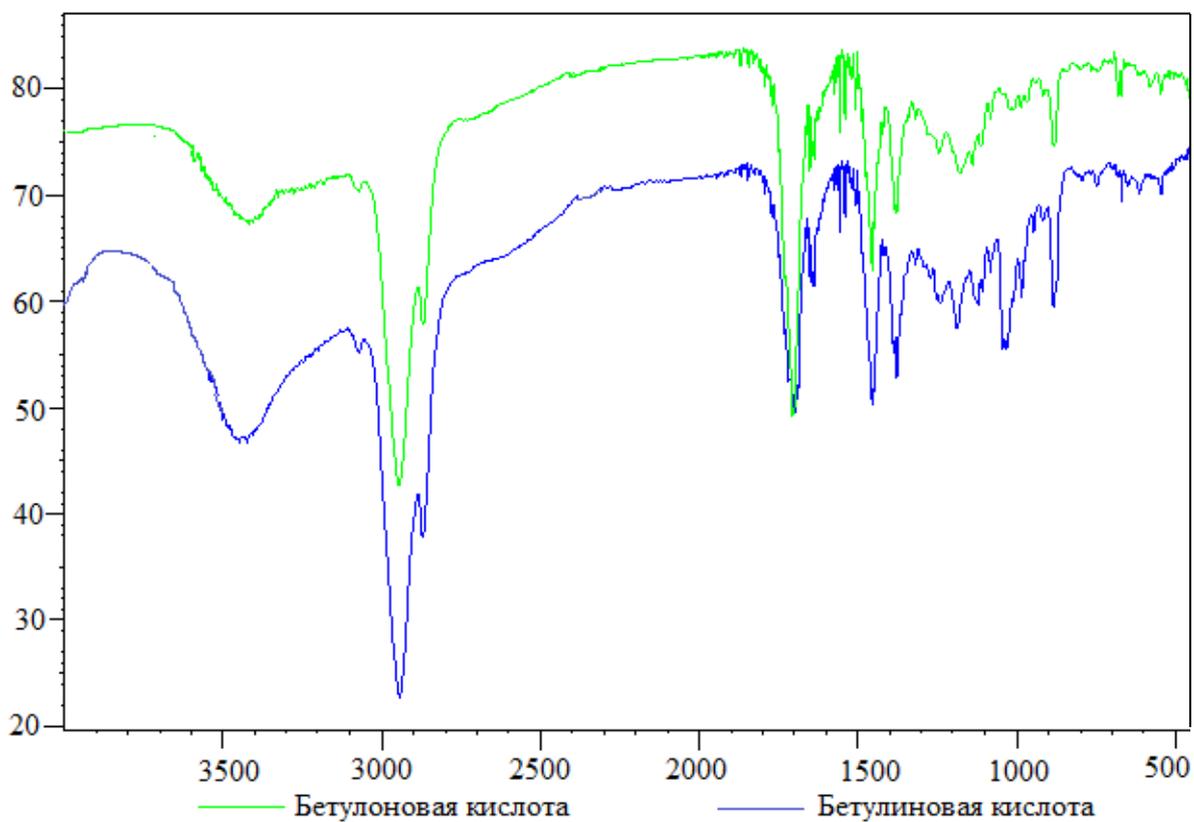


Рис. 3.1.16. ИК-спектры сравнения бетулоновой бетулиновой кислот.

Различия в ИК-спектрах бетулина, бетулоновой и бетулиновой кислот иллюстрирует рисунок 3.1.17. Метод ИК спектроскопии регистрирует колебания основных функциональных групп.

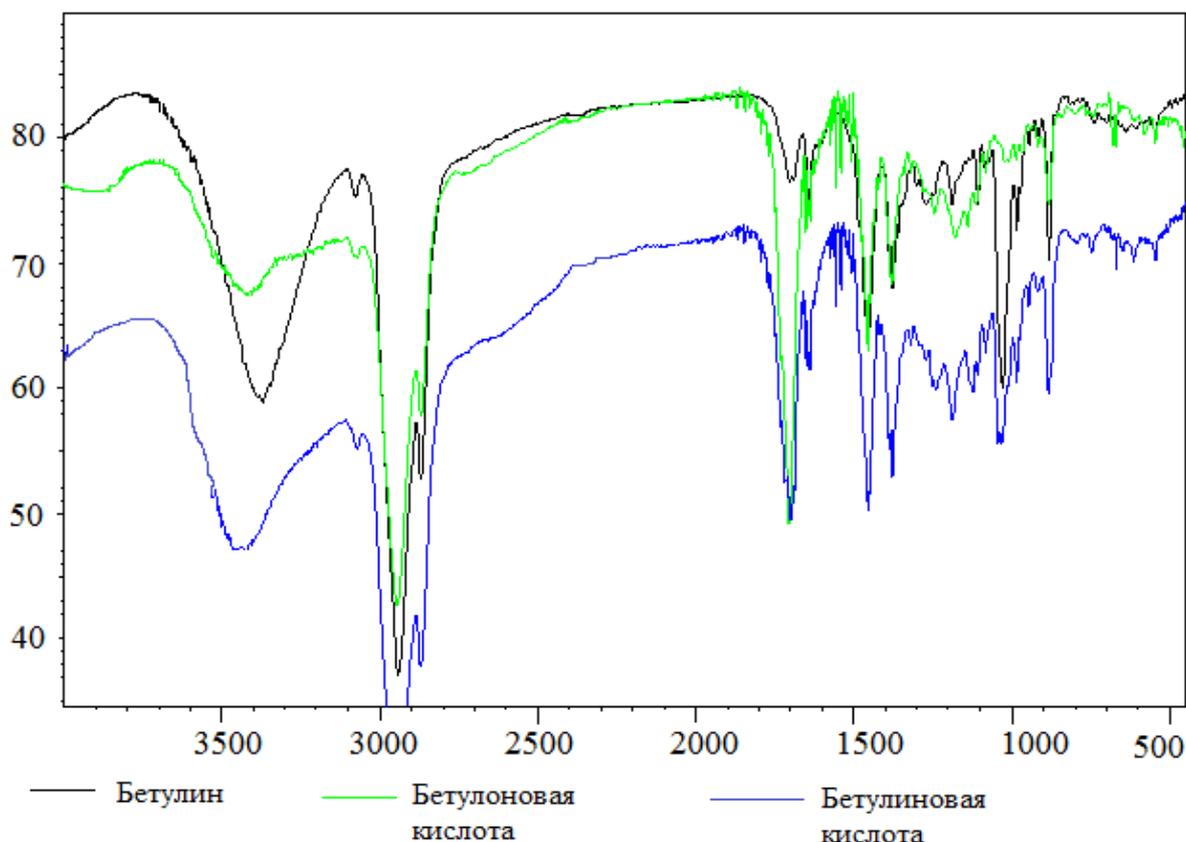


Рис. 3.1.17. ИК-спектры сравнения бетулина, бетулоновой и бетулиновой кислот.

В спектре бетулина в области 3500-3200 см⁻¹ наблюдаем широкую интенсивную полосу соответствующую валентным колебаниям ОН группы, полос в области 3000-2800 см⁻¹ соответствуют валентным колебаниям СН насыщенных фрагментов соединения. 1600 см⁻¹ (слабая по интенсивности полоса) – валентные колебания двойной связи углерод-углерод. 3050 см⁻¹ валентные колебания СН при двойной связи.

В спектре бетулоновой кислоты появились полосы, которые говорят о том, что у нас прошла реакция. В спектре появилась полоса 1680 см⁻¹, доказывающая наличие в структуре соединения С=О группы. Для бетулиновой кислоты наблюдается увеличение интенсивности полосы соответствующей

валентных колебаний ОН группы по сравнению с бетулоновой кислотой и уменьшение интенсивности полосы С=О.

Анализ ИК-спектров подтверждает протекание реакции окисления бетулина и последующего восстановления бетулоновой кислоты.

Анализ экспериментальных данных показал, что наиболее эффективным окислителем является смесь $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4$ на гранулах Al_2O_3 . А наибольший выход продукта восстановления бетулоновой кислоты боргидридом натрия достигается в среде диоксана при мольном соотношении кислота-восстановитель 1:4. Все данные по выходам продуктов реакций окисления и восстановления сведены в таблицу 3.1.2.

Таблица 3.1.2.

Выход бетулоновой (промежуточный продукт) и бетулиновой кислоты.

Процентное соотношение исходного и конечного продуктов

Бетулин, г	Окислитель	Всп. вещ-ва	Бетулоновая кислота		Бетулиновая кислота	
			м, г	w, %	м, г	w, %
1	Реактив Джонса	-	0.2	20%	0.174	17% от 1 г
						87% от 0,2г
1,5	$K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$	Al_2O_3	1.27	84%	1.17	78% от 1,5г
						92% от 1,27г
1	$K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$	SiO_2	-	-	-	-
1,5	$CrO_3 + CH_3COOH$	NaCl + диэтиловый эфир	-	-	-	-

3.2. Масс-спектрометрический анализ бетулиновой кислоты

Предварительные исследования для определения как бетулоновой, так и бетулиновой кислот методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием не позволили определить чистоту продуктов. Попытки дериватизации кислот метилатом натрия также не привели к регистрации масс-спектров дериватов. На наш взгляд, примененный температурный режим (испарителя, колонки) не приводит к возгонке как исходных, так и производных кислот.

Для определения молекулярной массы бетулиновой кислоты применили прямой МС-анализ метанольного раствора бетулиновой кислоты в режиме отрицательной ионизации (электроспрей).

На рисунке 3.1.18 представлен спектр по полному ионному току (а) и спектр компонента со временем 6,35 (б) и 22,71 (с) мин (рис. 3.1.18).

Данные рисунка свидетельствуют, что в режиме отрицательной ионизации происходит отрыв протона от карбонильной группы ($M-H$)⁻ и потеря протона ОН-группы: ($M-2H$)⁻.

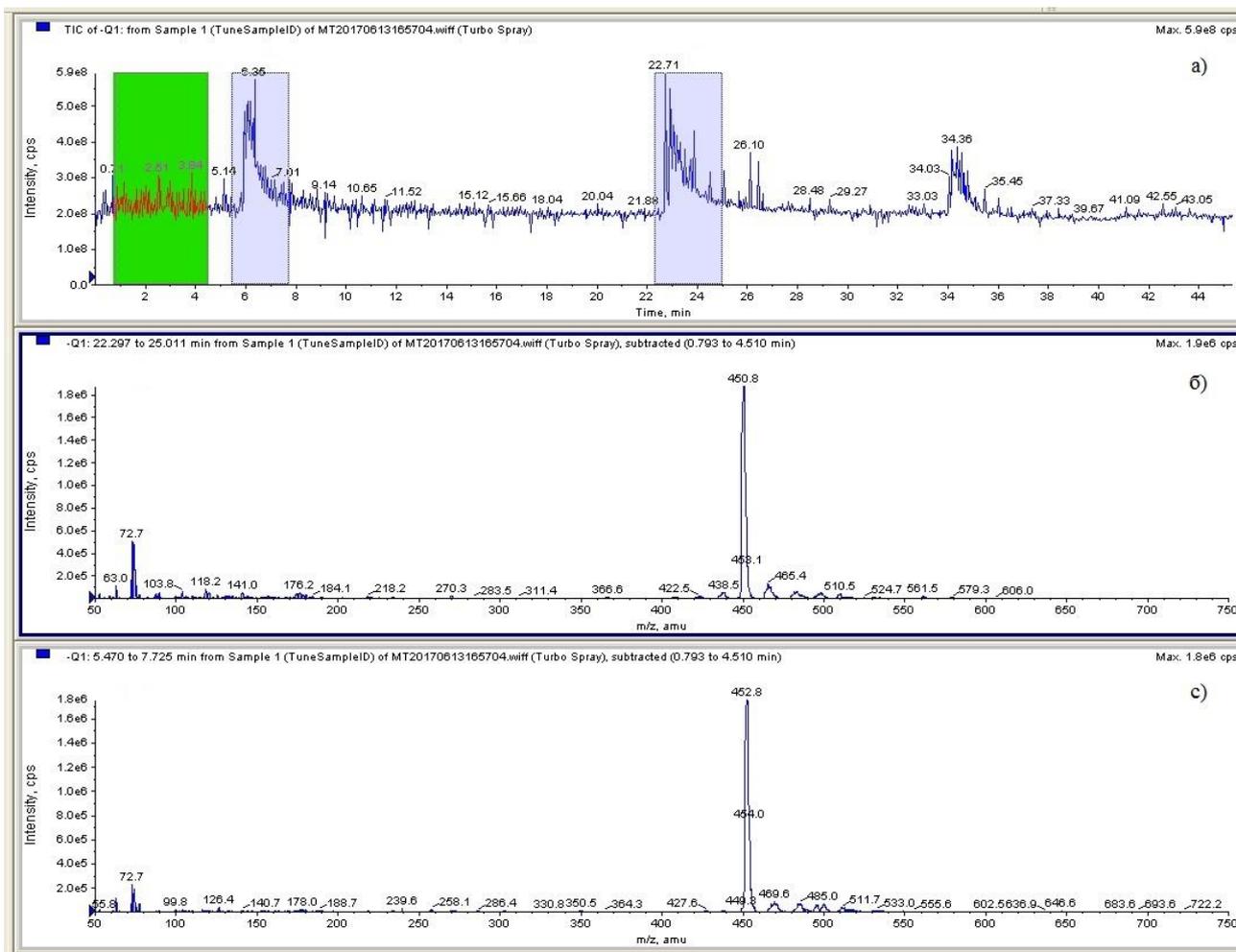


Рис. 3.1.18. Масс-спектр бетулиновой кислоты.

а – спектр по полному ионному току; б – спектр компонента со временем – 6,35 мин; с – спектр компонента со временем 22,71 мин.

Таким образом, прямой масс-спектрометрический анализ метанольного раствора бетулиновой кислоты позволил оценить чистоту продукта и определить ее молекулярную массу.

ВЫВОДЫ

Проведенный комплекс синтетических и аналитических работ позволяет сделать следующие выводы:

1. Оптимизирована методика количественного определения бетулина в опытных образцах на аналитическом и микроколоночном хроматографе. Установлено, что технология экстракции коры и бересты березы соответствующими растворителями позволяет получать продукт с чистотой 90%.
2. Исследована реакция окисления бетулина в бетулоновую кислоту в присутствии различных окислителей. Наибольшую эффективность проявил окислитель бихромат калия/серная кислота в присутствии оксида алюминия (выход конечного продукта – 77%).
3. Восстановлением бетулоновой кислоты боргидридом натрия в среде диоксана получена бетулиновая кислота выходом 85%.
4. Хроматографическими и спектральными методами доказана чистота промежуточных и конечных продуктов.
5. Впервые выполнено определение молекулярной массы бетулиновой кислоты методом прямого масс-спектрометрического анализа и доказана эффективность получения бетулиновой кислоты из опытных образцов бетулина производства ООО «СБК» (г. Тюмень).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецова С.А., Левданский В.А., Кузнецов Б.Н., Щипко М.Л., Рязанова Т.В., Ковальчук Н.М. Получение дубильных веществ, красителей и энтеросорбентов из луба березовой коры // химия в интересах устойчивого развития. 2005. №13. С. 401-409.
2. Толстиков Г.А., Флехтер О.Г., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстиков А.Г. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность // Химия в интересах устойчивого развития. 2005. №13. С. 2-4.
3. Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Шульц Э.Э., Покровский А.Г. Глицирризиновая кислота // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23, № 9. С. 691-709.
4. Cinta Penzaru S., Leopold N., Kieper W. Vibrational spectroscopy of betulonic acid [HIV inhibitor] and of its birch bark natural source // Talanta. 2002. Vol. 57, №4. Pp. 25-631.
5. Похило Н.Д., Уварова Н.И. Изопреноиды различных видов рода *Betula* // Химия природных соединений. 1988. № 3. С. 325–341.
6. Matsuda H., Ishikado A., Nishida N. Hepatoprotective, superoxide scavenging and antioxidant activities of aromatic constituents from the bark of *Betula platyphylla* var. *japonica* // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1998. V. 8. Pp. 2939-2944.
7. Urban M, Sarek J, Klinot J, Korinkova G, Hajduch M. Synthesis of A-seco derivatives of betulonic acid with cytotoxic activity. J Nat Prod. 2004 Jul; V. 67, Pp. 1100-1105.
8. Кузнецова С.А., Титова Н.М., Калачева Г.С., Зайбель И.А. Изучение состава и антиоксидантных свойств гексанового и этанольного экстрактов бересты // Вестник Красноярского государственного университета, Естественные науки. 2005. №2. С. 113-118.
9. Pavlova N.I., Savinova O.V., Nikolaeva S.N., Boreko E.I., Flekhter O.B. Antiviral activity of betulin, betulonic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. Fitoterapia. 2003 Jul; V. 74 Pp. 489-92.

10. Evers M., Poujade C., Soler F., Ribeill Y., James C., Lelièvre Y., Gueguen J.C., Reisdorf D., Morize I., Pauwels R., De Clercq E., Hénin Y., Bousseau A., Mayaux J.F., Le Pecq J.B., Dereu N. Betulinic acid derivatives: a new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action. *J Med Chem.* 1996 V. 39. Pp. 1056-1068.
11. Левданский В.А., Полежаева Н.И. Левданский А.В. Кузнецов В.Н. Изучение экстракции коры березы гексаном, этиацетатом, изопропиловым спиртом и водой // Вестник Красноярского государственного университета, Естественные науки. 2004. №2. С. 68-73.
12. Патент РФ, № 2298558, 2007.
13. Патент РФ, 2206572, 2003.
14. Кузнецова С.А., Скворцова Г.П., Калачева Г.С., Зайбель И.А., Ханчич О.А. Изучение состава этанольного экстракта бересты и его токсико-фармакологических свойств // Химия растительного сырья, 2010. №1.
15. Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Веселова О.Ф., Кукина Т.П., Калачева Г.С., Скворцова Г.П., Редькина Е.С. Изучение состава гексанового экстракта бересты и его токсико-фармакологических свойств // Химия растительного сырья, 2008. №1. С. 45–49.
16. Патент РФ, 2463306, 2012.
17. Бакибаев А.А., Жук В.В., Медведев Д.М., Яговкин А.Ю., Яновский В.А. Способ получения экстрактивных веществ из бересты березы // Известия Томского политехнического университета, 2007. Т. 311, № 3. С. 99-101.
18. Селянина Л. И. Выделение бетулина из отходов переработки березы экстракцией спиртом // Лесной журнал, 2004. №4. С. 92-96.
19. Жук В.В., Яновский В.А., Самбуева О.Б., Бакибаев А.А. Технология получения бетулина методом тонкопленочной парофазной экстракции // Химия растительного сырья, 2014. №3. С. 247-253.
20. Михайленко М.А., Шахтштейндер Т.П., Брезгунова М.Е., Дребущак В.А., Кузнецова С.А., Болдырев В.В. Получение и исследование физико-

- химических свойств сольватов бетулина // Химия растительного сырья, 2010. №2. С. 63-70.
21. Патент РФ № 2324700, 2008.
 22. Barthel A., Stark S., Csuk R. Oxidative transformations of betulinol //Tetrahedron Journal. 2008. V. 64. Pp. 9225–9229.
 23. Ле Банг Шон, Каплун А.П., Шпилевский А.А. Синтез бетулиновой кислоты из бетулина и исследование ее солюбилизации с помощью липосом //Биоорганическая химия. 1998. Т.24, №10. С.787-793.
 24. Флехтер О.Б., Нигматуллина Л.Р., Балтина Л.А., Карачурина Л.Т., Галин Ф.З., Зарудий Ф.С., Толстиков Г.А., Бореко Е.И., Павлова Н.И., Николаева С.Н., Савинов О.В. Получение бетулиновой кислоты из экстракта бетулина. Противовирусная и противоязвенная активность некоторых родственных терпеноидов // Химико-фармацевтический журнал. 2002. Т. 36. № 9. С. 26–28.
 25. Csuk R., Schmuck K., Schafer R. A practical synthesis of betulinic acid // Tetrahe-dron Lett. 2006. V. 47. P. 8769–8770.
 26. Lee C-K. A new norlupene form the Leaves of Malaleuca Leucadendron // J. Nat. Prod. 1998. V. 61. Pp. 375-376.
 27. Флехтер О.Б., Медведева Н.И., Карачурина Л.Т., Балтина Л.А., Галин Ф.З., Зарудий Ф.С., Толстиков Г.А. Синтез и фармакологическая активность эфиров бетулина, бетулиновой кислоты и аллобетулина // Химико-фармацевтический журнал. 2005. Т.39. №8. С. 9–12.
 28. Патент РФ, № 2174126, 2001.
 29. Патент РФ, №2192879, 2002.
 30. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Толстиков Г.А., Толстиков А.Г., Флехтер О.Б. Терпеноиды ряда лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы // Биоорганическая химия. 2006. Т. 32. №1. С. 37 – 49.
 31. Кислицын А.Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, применение // Химия древесины. 1994. № 3. С. 3 – 28.

32. Патент РФ, № 2010109112/04, 2011.
33. Mansoor S.S., Shafi S.S. Studies on the Kinetics of Benzyltrimethylammonium Fluorochromate Oxidation of Substituted Benzaldehydes in Aqueous Acetic Acid Medium // *J. ChemTech Res.* 2009. V. 1. Pp. 1206–1212.
34. Бурлова И.В., Мельникова Н.Б., Клабукова И.Н., Кислицын А.Н. Контролируемый синтез бетулонового альдегида окислением бетулина на силикагеле // *Известия вузов. Химия и Химическая технология.* 2011. Т. 54. № 11. С. 46–49.
35. Melnikova N., Burlova I., Kiseleva T., Klabukova I., Gulenova M., Kislitsin A., Vasin V., Tanaseichuk B. A Practical Synthesis of Betulonic Acid Using Selective Oxidation of Betulin on Aluminium Solid Support // *Molecules.* 2012. V. 17. Pp. 11849 – 11863.
36. Бурлова, И.В, Жильцова О.Е. Синтез производных бетулина на твердой подложке и прогнозирование их биодоступности // *Труды молодых ученых по естественнонаучным дисциплинам «Нижегородская сессия молодых ученых».* Нижний Новгород. 2010. 153 с.
37. Pisha E. Method for selectivity inhibiting melanoma, using betulinic acid // *Nat. Med.* 1995. V. 1. P. 1046–1051.
38. Бурлова, И.В. Синтез производных бетулина гетерогенным окислением на оксиде алюминия // *Сборник материалов Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Актуальные проблемы органической химии».* Казань. 2010. 276 с.
39. Lekhal A., Glasser B.J., Khinast J.G. Impact of Drying on the Catalyst Profile in Supported Impregnation Catalysts // *Chem. Eng. Sci.* 2001. V. 56. Pp. 4473–4487.
40. Kim Darrick S.H.L., Zhidong C., Nguen van Tuyen. A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin // *Synth Commun.* 1997. V. 27, №9. P. 1607–1612.
41. Яновская Л.А., Юфит С.С. Органический синтез в двухфазных системах. М.: Химия. 1982. 184 с.

42. Когай Т.И., Кузнецов Б.Н. Восстановление бетулоновой кислоты в бетулиновую кислоту в условиях межфазного катализа // Химия растительного сырья. 2008. № 2. С. 95-98.
43. Петерс Д., Хайес Дж., Хифтье Г. Химическое разделение и измерение. М.: Химия. 1978. С. 737–739.
44. Bastos D.Z.L., Pimentel I.C., de Jesus D.A., de Oliveira B.H. Biotransformation of Betulinic and Betulonic Acids by Fungi // Phytochemistry. 2007. V. 68. Pp. 834–839.
45. Патент РФ, 2271364, 2006.
46. Fujioka T. Compounds and methods of use to treat HIV infections // J. Nat. Prod. 1994. V. 57. P. 243–247.
47. Патент РФ, № 2428426, 2011.
48. Chen I.-H.; Du Y.-C., Lu M.-C., Lin A.-S., Hsieh P.-W., Wu C.-C., Chen S.-L., Yen H.-F., Chang F.-R., Wu Y.-C. Lupane-type Triterpenoids from *Microtropis fokienensis* and *Perrottetia arisanensis* and the Apoptotic Effect of 28-Hydroxy-3-oxo-lup-20(29)-en-30-al // J. Nat. Prod. 2008. V. 71. Pp. 1352–1357.