

УДК 634.085:582.632+547.914

Получение диацетата бетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантной активности

Светлана А. Кузнецова^{а,б*}, Наталья Ю. Васильева^б,
Галина С. Калачева^в, Надежда М. Титова^б,
Евгения С. Редькина^а, Галина П. Скворцова^а

^а Институт химии и химической технологии СО РАН,
Академгородок, Красноярск, 660036 Россия

^б Сибирский федеральный университет,
пр. Свободный, 79, Красноярск, 660041 Россия

^в Институт биофизики СО РАН,
Академгородок, Красноярск, 660036 Россия ¹

Received 2.06.2008, received in revised form 25.08.2008, accepted 27.08.2008

Предложен способ получения диацетата бетулина из бересты коры березы, совмещающий стадии экстракции бетулина из бересты уксусной кислотой и его этерификации. Способ не требует предварительного выделения бетулина и использования катализаторов этерификации. Структура диацетата бетулина подтверждена с помощью хромато-масс-спектрометрии, FTIR и ЯМР-спектроскопии. Изучена антиоксидантная активность полученного диацетата бетулина в экспериментах in vitro и in vivo.

Ключевые слова: береста коры березы, диацетат бетулина, получение, идентификация, антиоксидантная активность.

Введение

Вещества растительного происхождения находят широкое применение в качестве биологически активных добавок и лекарственных средств [1]. В последнее время возрастает внимание специалистов к растительным тритерпеноидам, сочетающим их доступность с ценной биологической активностью [2-5]. Один из естественных источников лупановых тритерпеноидов – внешняя часть коры березы – береста. Кора берёзы, отход деревопереработки, содержит до 40 % бетулина [6-8]. Бетулин и

его производные проявляют широкий спектр биологической активности (противовирусную, противовязвенную, противоопухолевую, капилляроукрепляющую и другую) [2-5, 9-12].

Целенаправленная химическая модификация природных биологически активных соединений приводит в ряде случаев к получению веществ, которые обладают более широким спектром действия и низкой токсичностью. Показано, что ацилаты бетулина способны на противоопухолевое действие [13]. Среди ацилатов бетулина установлены высокоактивные вещества, такие как диникотинат,

* Corresponding author E-mail address: ksa@icct.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

бисгемисукцинат, бисгемифиалат бетулина и другие, проявляющие гепатопротекторную и анти-ВИЧ-активность. Диникотинат бетулина способствует восстановлению уровня маркерных ферментов сыворотки крови, щелочной фосфатазы и билирубина. Кроме того, данное соединение уменьшает интенсивность процесса пероксидного окисления липидов в $\approx 1,8$ раза и обладает тем самым антиоксидантными свойствами [9]. Некоторые из ацилатов бетулина обладают гепатопротекторной, противовоспалительной, противовирусной и иммуномодулирующей активностью [4–12].

Диацетат бетулинола [$3\beta,28$ -диацетоксипуп-20(29)-ен(1)] (рис.1) обладает гиполипидемическим и желчегонным действием [2, 3]. Кроме того, диацетат бетулинола служит сырьем для многих органических синтезов, таких как получение бетулиновой кислоты, серопроизводных бетулина, синтез аминопроизводных диацетата бетулина и других [14, 15].

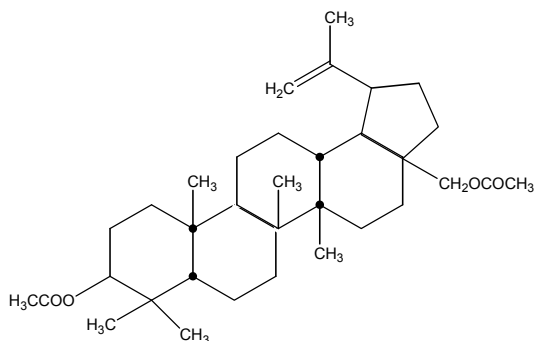


Рис. 1. Диацетат бетулина

Известные способы получения диацетата бетулина основаны на классических реакциях ацетилирования бетулина, предварительно выделенного из коры березы [14, 16–18]. Как правило, они являются многостадийными и нередко требуют использования токсичных и дорогостоящих реагентов. Известно, что попытка синтеза диацетата бетулина прямой этерификацией бетулина уксусной кислотой без использования минеральной кислоты в каче-

стве катализатора не позволила получить целевой продукт высокого качества. Кроме того, несмотря на постоянное усовершенствование способов извлечения бетулина из бересты, процесс его получения остается технически сложным. Все это удорожает синтез диацетата бетулина и не дает возможности достичь его высокого выхода в расчете на исходное содержание бетулина в березовой коре.

Целью данного исследования стала разработка нового простого способа получения диацетата бетулина непосредственно из бересты коры березы, идентификация и подтверждение его структуры, изучение его антиоксидантной активности.

Экспериментальная часть

Получение диацетата бетулина

В качестве сырья использовали бересту коры березы *Betula pendula* Roth., заготовленную в районе г. Красноярск. Химический состав бересты коры березы представлен в табл. 1 [19].

Синтез диацетата бетулина проводили путем обработки бересты, измельченной до фракции 2 – 5 мм и высушенной при температуре 105 °С до влажности менее 2 %, ледяной уксусной кислотой при температуре ее кипения в круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником. После завершения реакции уксусную кислоту отгоняли на ротном испарителе до 1/10 объема, а остаток выливали в пятикратное количество воды. Выпавший осадок отфильтровывали, многократно промывали на фильтре дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Перекристаллизацию полученного продукта проводили из этанола с применением активированного угля марки ОУ-Г.

Анализ и идентификацию полученных продуктов до перекристаллизации и чистого диацетата бетулина исследовали на хромато-

Таблица 1. Химический состав бересты коры березы

Вещества	Содержание, % от массы а.с.б.*
Зольные вещества	0,52
Вещества, экстрагируемые этанолом	24,28
Вещества, экстрагируемые водой	4,49
Целлюлоза	3,85
Лигнин	-
Пентозаны	4,80
Общие метоксильные группы	2,59
Уроновые кислоты	2,2
Ацетильные группы	1,1
Суберин	34,4

* а.с.б.- абсолютно сухой бересты.

масс-спектрометре GCD Plus (“Hewlett Packard”, США) в Центре коллективного пользования Красноярского научного центра.

Условия хроматографирования были следующими: температура ввода пробы – 250 °С, скорость подъёма температуры – 5,00 °С/мин, скорость потока газа-носителя гелия через колонку – 1,0 мл/мин; температура трансферной линии – 250°C, источника ионов – 165°C, режим электронного удара при 70 eV, режим сканирования фрагментов – от 45 до 450 m/z при 0,5 с/сек. Применяли капиллярную колонку HP-5S, длина – 30 м, диаметр – 0,25 мм. Содержание компонентов вычисляли по площадям газохроматографических пиков. Качественный анализ проводили, сравнивая времена удерживания и полных масс-спектров с соответствующими данными библиотеки масс-спектрометра.

ИК-спектроскопическое исследование полученного продукта выполнено на FTIR-Фурье спектрометре Vector 22 (Bruker). Диацетат бетулина прессовали с бромистым калием в специальной матрице. Обработку спектральной информации проводили с использованием программы OPUS/Y (версия 2.2). ЯМР-спектроскопическое исследование

веществ было произведено на спектрометре Bruker DPX-200 при частоте 200 MHz = (¹H), растворитель – CDCl₃.

Элементный анализ экстрактов проводили с использованием элементного анализатора FLASHTM 1112.

Контроль на содержание примесей осуществлялся также с помощью ТСХ на пластинках «Silufol», элюент – хлороформ : этанол (20:1).

Изучение антиоксидантной активности

Антиоксидантную активность диацетата бетулина изучали в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [20-25].

В экспериментах *in vivo* интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) осуществляли на белых беспородных крысах весом 200 – 300 г в условиях плавающего стресса. Антиоксидантную активность оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) и активности ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

Экспериментальные животные разделялись на три группы: здоровые (интактные), стрессовые и опытные. Здоровые животные в течение всего эксперимента содержались в виварии при комнатной температуре без ограни-

чений в воде и пище. Стрессовую и опытную группы крыс подвергали тренировке плаванием с нагрузкой в бассейне с водой в течение 2 недель ежедневно. Опытной группе крыс за 30 минут до начала тренировки перорально вводили суспензию, содержащую диацетат бетулина (50 мг диацетата бетулина на 1 кг веса тела животного).

Принцип метода определения супероксиддисмутазы основан на ингибировании реакции аутоокисления адреналина в щелочной среде в присутствии СОД вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, которые являются продуктом одного из этапов окисления. Об интенсивности аутоокисления адреналина судили по динамическому нарастанию поглощения при длине волны 347 нм (спектрофотометр «СФ-46»), обусловленному накоплением продуктов окисления и опережающим по времени образованием адrenoхрома, имеющего максимум поглощения при 480 нм.

В качестве источника СОД использовали эритроцитарный гемолизат и супернатант от гемолизата печени. В пробирку добавляли 50 мкл упакованных эритроцитов и 450 мкл охлажденной дистиллированной воды. Нейтрализацию гемоглобина производили добавлением 250 мкл смеси этанол/хлороформ (2:1). Полученную суспензию интенсивно перемешивали и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 15 минут. Супернатант использовали для определения активности СОД. Определение активности СОД в гомогенате печени проводили аналогично. Для расчета активности СОД использовали показатели величины поглощения холостой и опытной проб. За условную единицу активности СОД принято 50 %-е ингибирование реакции окисления адреналина. Процент блокирования аутоокисления производился по формуле $E.a(50\%) = (E_{хол} - E_{оп}) \times 100\% / E_{хол}$, где $E_{хол}$ – экс-

тинция холостой пробы; $E_{оп}$ – экстинция опытной пробы.

Активность каталазы определяли по образованию окрашенного в желтый цвет комплекса не разрушенной в ходе каталазной реакции перекиси водорода с молибдатом аммония на фотоколориметре «КФК-2». Активность каталазы рассчитывали по формуле $A = (E_{хол} + E_{оп}) / (V \cdot t \cdot K)$, где A – активность каталазы, моль/(мин*мл); $E_{хол}$ – экстинция холостой пробы; $E_{оп}$ – экстинция опытной пробы; V – объем вносимого образца, мл; t – время инкубации, с; K – коэффициент экстинции, равный $22,2 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Содержание малонового диальдегида определяли на спектрофотометре «СФ-46». При взаимодействии МДА с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) происходит образование хромогена с максимумом поглощения при длине волны 532 нм. Расчет концентрации МДА производили по формуле $C = E \cdot f / K$, где C – концентрация МДА, моль/мл (или на грамм ткани); E – оптическая плотность при длине волны 532 нм; f – коэффициент разведения; K – коэффициент экстинции МДА, равный $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

В экспериментах *in vitro* активацию перекисного окисления липидов вызывали введением аскорбата и сульфата железа (II) в реакционные смеси, содержащие эритроциты и плазму крови крыс. Об уровне антиоксидантной активности также судили по содержанию малонового диальдегида (МДА) и активности ферментов супероксидивисмутазы (СОД) и каталазы.

Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики с применением программы EXCEL. Для оценки статистической достоверности различий сравниваемых средних величин использовали критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Оптимизация условий синтеза диацетата бетулина из бересты коры березы

Для подбора условий ацетилирования бересты уксусной кислотой, обеспечивающих максимальный выход диацетата бетулина, варьировали продолжительность процесса ацетилирования от 0,5 до 18 часов и гидромодуль (соотношение объема бересты к объему уксусной кислоты) от 1 : 20 до 1: 50.

На рис. 2 представлены ионные хроматограммы продуктов ацетилирования бересты кипящей уксусной кислотой в течение 0,5 (рис. 2А) и 18 часов (рис. 2 Б).

Установлено, что основными компонентами выделенного из бересты продукта являются бетулин и диацетат бетулина. Кроме того, в небольших количествах присутствуют лупеол, ацетат лупеола и среди прочих – моноацетат бетулина.

В зависимости от условий обработки бересты уксусной кислотой выход неочищенного продукта варьировался от 28,0 до 43,9 % от массы абсолютно сухой бересты. Установлено, что максимальный выход продукта (43,9 %) с наибольшим содержанием диацетата бетулина

(83,5 %) получен в колбе при гидромодуле 1: 20 и продолжительности процесса 18 ч.

Данные табл. 2 иллюстрируют влияние продолжительности процесса обработки бересты кипящей уксусной кислотой на выход и состав твердого продукта при гидромодуле 1:20. Идентификация компонентов твердого продукта при разной продолжительности реакции была проведена с помощью хромато-масс-спектрометрии.

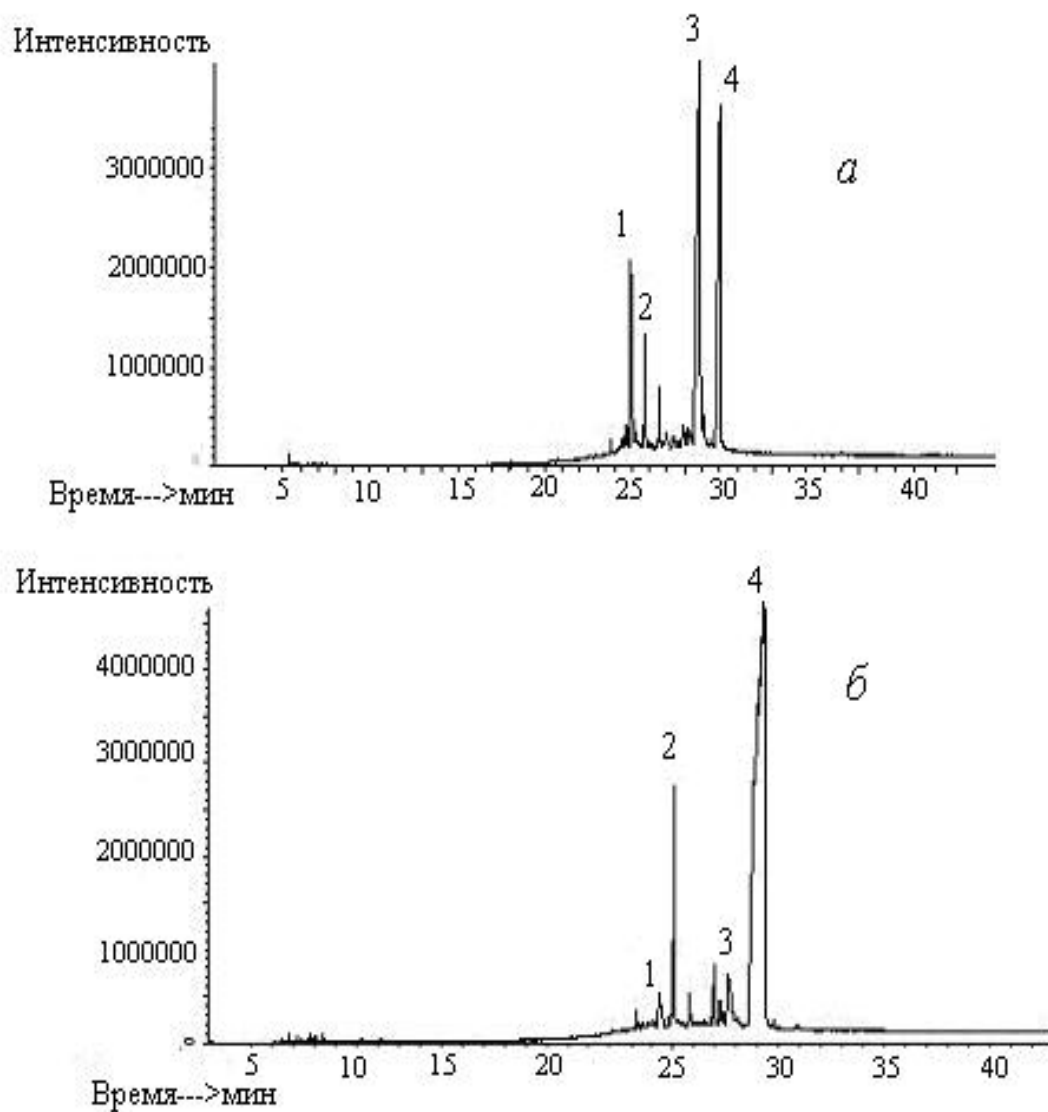
Как следует из полученных результатов, с увеличением продолжительности обработки бересты уксусной кислотой с 0,5 до 18 часов выход продукта возрастет с 32,6 до 43,9 % от массы абсолютно сухой бересты. При этом содержание диацетата бетулина в продукте возрастает с 33,1 до 83,5 %, и одновременно уменьшается содержание бетулина с 51,3 до 3,7 %.

Проведенные эксперименты подтверждают, что при обработке бересты коры березы уксусной кислотой одновременно с извлечением бетулина и лупеола идет его этерификация. Через 30 мин после начала реакции содержание бетулина составляет 51,3 %, лупеола 9,2 %, а диацетата бетулина – 33,1 %. При продолжительности реакции более 30 мин и боль-

Таблица 2. Влияние продолжительности процесса обработки бересты кипящей уксусной кислотой на выход и состав твердого продукта (ГМ 1:20)

Продолжительность, ч	Выход продукта, % от массы абсолютно сухой бересты	Состав продукта, % от массы продукта*				
		Диацетат бетулина	Бетулин	Лупеол	Ацетат лупеола	Прочие
0,5	32,6	33,1	51,3	9,2	4,3	2,1
4	37,5	67,1	22,6	2,7	4,8	2,8
6	38,8	68,8	22,6	1,7	5,0	1,9
8	39,8	72,8	17,5	2,2	5,5	2,0
10	39,7	77,6	8,7	0,8	7,4	5,5
14	40,8	81,2	5,0	0,4	7,0	6,4
18	43,9	83,5	3,7	1,0	6,3	5,5

* Данные хромато-масс-спектрометрического анализа



1 – лупеол, 2 – ацетат лупеола, 3 – бетулин, 4 – диацетат бетулина

Рис. 2. Ионные хроматограммы продуктов ацетилирования бересты уксусной кислотой при продолжительности реакции 0,5 ч (А) и 18 ч (Б)

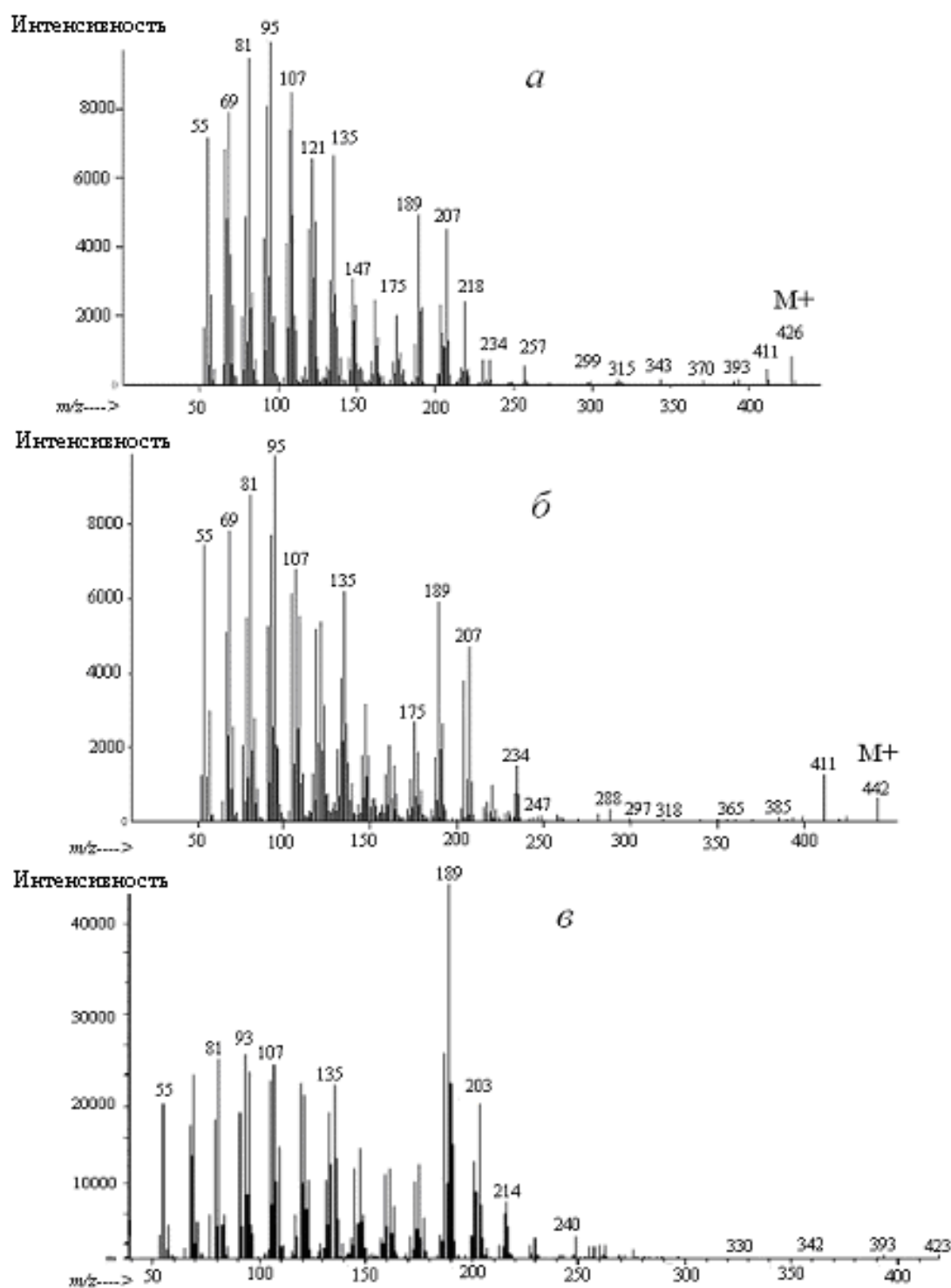


Рис. 3. Масс-спектры лулеола (а), бетулина (б), диацетата бетулина (в)

шом избытке уксусной кислоты (ГМ 1 : 20) равновесная реакция этерификации смещается в сторону образования эфира. Уже через 4 часа от начала реакции содержание бетулина в продукте уменьшается до 22,6 %, содержание лупеола – до 2,7 %, в то время как содержание диацетата бетулина возрастает до 67,1 %. Через 10 часов после начала реакции содержание диацетата бетулина в продукте составляет 77,6 %, бетулина – 8,7 %, а ацетата лупеола – 7,4 %.

Перекристаллизованный из этанола диацетат бетулина желтоватого цвета имеет температуру плавления 222 - 223 °С, что соответствует температуре плавления диацетата бетулина, полученного встречным синтезом по известной методике [26].

На основании данных элементного анализа найдено, %: (С) 78,06; (Н) 10,2; (О) 11,9. Вычислено, %: (С) 77,6; (Н) 10,3; (О) 12,2.

Данные FTIR, ¹Н ЯМР-спектроскопии и тонкослойной хроматографии (ТСХ) также идентифицируют полученный продукт как

диацетат бетулина (3β,28-диацетокси-луп 20 (29)-ен), C₃₄H₅₄O₄.

ИК-спектр (ν, см⁻¹): 3070,9 (C=C); 2953,56; 2872,73 (C-H); 1739,93 (C=O); 1458,23; 1391,79; 1368,56 (C-C); 1246,14; 1151,11; 1108,63 (C-O-C).

Спектр ¹Н-ЯМР: 4,72 (1H, м, =CH₂); 4,55 (1H, м, =CH₂); 4,47 (1H, м, H3); 4,26 (1H, д, J10.7 Гц, H28); 3,86 (1H, д, J10.7 Гц, H28); 2,50 (1H, м, H19); 2,08 (3H, с, CH₃CO); 2,03 (3H, с, CH₃CO); 1,65; 1,02; 0,94; 0,82; 0,80 (все 3H, с, CH₃).

На рис. 3 представлены масс-спектры перекристаллизованных лупеола, бетулина, диацетата бетулина.

На рис. 4 изображена ионная хроматограмма перекристаллизованного продукта ацетилирования бересты уксусной кислотой.

Согласно данным хромато-масс-спектрометрии установлено, что перекристаллизованный из этилового спирта продукт ацетилиза бересты содержит 95,3 % диацетата бетулина и 4,7 % ацетата лупеола.

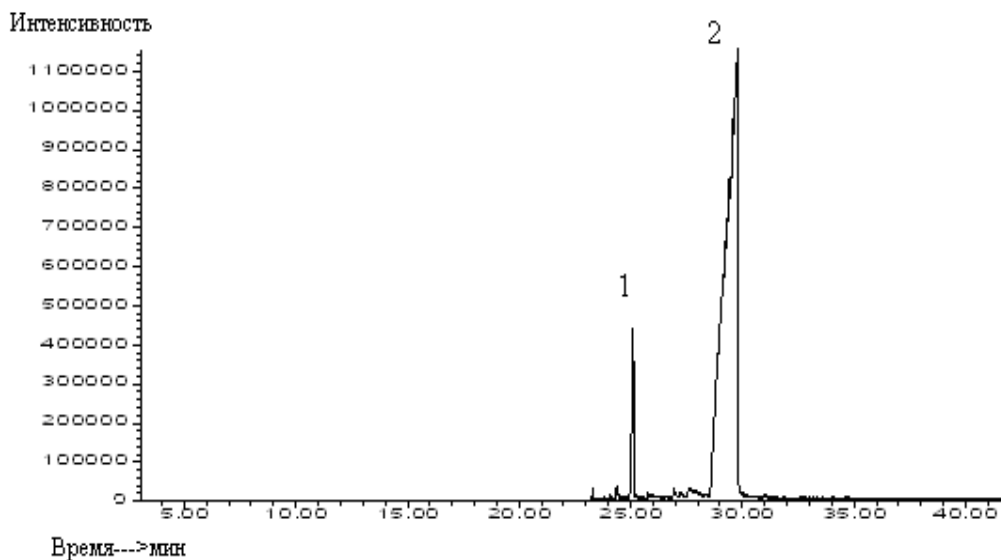


Рис. 4. Ионная хроматограмма перекристаллизованного продукта ацетилирования бересты уксусной кислотой

Исследование антиоксидантной активности диацетата бетулина в эксперименте in vivo в условиях плавательного стресса

Антиоксидантные свойства вещества характеризуются способностью восстанавливать активность компонентов защитной системы клетки и снижать содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Наиболее подходящей системой для изучения антиоксидантной активности могут быть защитные ферменты клеток печени и эритроцитов крови в условиях окислительного стресса. Для обнаружения радикальных окислительных процессов и оценки их активности существует много способов определения содержания в образцах отдельных альдегидов, кетонов или карбонильных групп. В клинических и биологических исследованиях широкое применение получил колориметрический метод определения малонового диальдегида (МДА) в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), или МДА-метод [20-25].

Результаты экспериментов по определению МДА в печени и эритроцитах крови экспериментальных крыс представлены в табл. 3.

Как видно из приведенных в табл. 3 данных, концентрация МДА стрессовой группы животных превышает показатели МДА интактных животных на 21 %, а концентрация МДА в эритроцитах стрессовой группы повышается

на 57 %. Достоверное увеличение количества МДА в тканях крыс, подвергавшихся тренировке (стресс), по сравнению с контрольными животными, согласуется с литературными данными [24]. Следует отметить, что концентрация МДА в печени и эритроцитах опытной группы крыс, получающих диацетат бетулина, снижается практически до значений МДА в печени и эритроцитах интактных животных и составляет МДА печени опытной группы 439 ± 10 нмоль/г ткани (у интактных животных – 434 ± 20 нмоль/г ткани), а МДА в эритроцитах опытной группы животных составляет $8,0 \pm 0,4$ нмоль/мл (интактной группы – $7,0 \pm 0,3$ нмоль/мл).

Результаты исследования активности СОД представлены на рис. 5. У стрессовой группы животных активность СОД оказалась ниже, чем у здоровых, на 36 % в печени и на 29 % в эритроцитах. Это указывает на то, что в организме крыс происходят изменения метаболизма под воздействием стресс-фактора.

Вероятно, снижение активности СОД у стрессовых животных вызвано повышением продукции активных метаболитов кислорода и промежуточных продуктов ПОЛ, которые в свою очередь связываются с ферментом и не дают ему утилизировать АФК, либо чрезмерное накопление этих продуктов ингибирует процесс синтеза СОД. В пользу такого предположения свидетельствуют полученные

Таблица 3. Содержание МДА в печени и эритроцитах экспериментальных крыс

Условия эксперимента	Количество МДА	
	печень, нмоль/г ткани	эритроциты, нмоль/мл
Интактные животные (n=5)	434 ± 20	$7,0 \pm 0,3$
Стрессовая группа (n=5)	525 ± 10 ($p < 0,01$)*	$11,0 \pm 0,5$ ($p < 0,001$)*
Опытная группа (n=5)	439 ± 10 ($p < 0,01$)**	$8,0 \pm 0,4$ ($p < 0,001$)**

Примечание: n – число параллельных определений, p – доверительная вероятность.

* – достоверность различий стрессовой группы по сравнению с интактными животными.

** – достоверность различий опытной группы по сравнению со стрессовой группой.

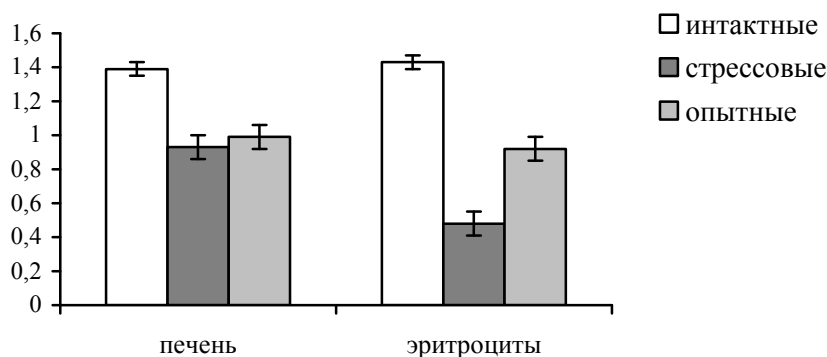


Рис. 5. Активность СОД в печени и эритроцитах экспериментальных крыс (у.е./мл и у.е./г ткани для печени)

Таблица 4. Активность каталазы в печени и эритроцитах животных

Условия эксперимента	Активность каталазы	
	печень, моль/(мин*г ткани)	эритроциты, моль/(мин*мл)
интактные животные (n=5)	26,6±0,4	2,50±0,06
стрессовая группа (n=5)	22,8±0,7 (p<0,01)*	2,64±0,02 (p<0,05)*
опытная группа (n=5)	28,5±1,8 (p<0,05)**	3,07±0,07 (p<0,01)**

Примечание: n – число параллельных определений, p – доверительная вероятность.

* – достоверность различий стрессовой группы по сравнению с интактными животными.

** – достоверность различий опытной группы по сравнению со стрессовой группой.

нами данные о повышении уровня МДА у животных при стрессе.

Показатели активности СОД у животных, получавших диацетат бетулина, оказались выше показателей стрессовой группы (на 6 % в печени и на 92 % в эритроцитах), что свидетельствует о восстановлении процесса образования и активности СОД опытных животных по сравнению с животными стрессовой группы и о тенденции к нормализации функционирования антиоксидантной системы. Однако активность СОД как в гепатоцитах, так и в эритроцитах не достигает контрольной величины.

Получены данные об активности каталазы в печени и эритроцитах экспериментальных крыс (табл. 4).

Активность эритроцитарной каталазы стрессовой группы животных возросла на 6 %

по сравнению с интактными животными. В то время как активность каталазы крыс, получавших диацетат бетулина, возросла по сравнению с интактными животными на 23 %.

Каталазная активность в клетках печени стрессовой группы крыс по сравнению с интактными животными снизилась на 17 %, а у опытных животных, напротив, наблюдается повышение активности каталазы в клетках печени по сравнению со стрессовой группой крыс на 25 %, а по сравнению с интактными животными – на 7 %. Снижение активности каталазы в печени можно объяснить снижением активности СОД, так как СОД утилизирует O_2^- с образованием H_2O_2 .

При воздействии нагрузки на организм возможно изменение физико-химических процессов, протекающих в клетке. Можно предположить, что влияние нагрузки на био-

химические процессы может быть опосредовано через ПОЛ и связано с изменением спина взаимодействующих радикалов. Результаты проведенной работы показывают, что тренировочная нагрузка оказывает влияние на активность СОД, каталазы и продуктов ПОЛ.

Рассмотренные данные свидетельствуют о том, что систематическое введение диацетата бетулина при физической нагрузке приводит к понижению интенсивности ПОЛ в организме белых крыс. Под влиянием этого вещества в исследованных образцах тканей опытной группы крыс по сравнению со стрессовой существенно уменьшается уровень МДА, повышается активность СОД и каталазы. Наблюдаемый эффект можно объяснить антирадикальной активностью диацетата бетулина.

Исследование антиоксидантной активности диацетата бетулина в эксперименте in vitro в условиях плавательного стресса

Об антиоксидантном действии продукта ацетоллиза в эксперименте *in vitro* судили по его способности влиять на накопление МДА, а также на активность СОД и каталазы. В условиях эксперимента использовали спиртовой раствор диацетата бетулина концентрацией 100 мкг/г ткани. Показатели снимали в нулевой, 30- и 60-минутный промежуток с момента создания окислительного стресса. Данные по содержанию МДА в клетках печени представлены в табл. 5.

Из полученных данных видно, что моделирование окислительного стресса *in vitro* сопровождалось увеличением МДА, особенно хорошо это наблюдается через 30 минут после воздействия окислительного стресса. Содержание МДА в стрессовой пробе по сравнению с контрольной увеличилось на 127 %. Введение в рацион опытной группы животных антиоксиданта диацетата бетулина снизило

содержание МДА на 62 % по сравнению со стрессовой группой.

Поскольку максимальное содержание МДА при окислительном стрессе наблюдалось через 30 минут после инкубации гомогената печени с Fe^{2+} и аскорбатом, то именно этот временной интервал был выбран нами для изучения влияния диацетата бетулина на антиоксидантные ферменты – активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

Согласно полученным данным, стрессовая нагрузка снижает активность СОД на 17 %, по сравнению с контролем через 30 минут после начала тренировки. При введении в прикорм животным диацетата бетулина активность СОД опытной группы возросла на 77 % по сравнению со стрессовой группой крыс.

Влияние диацетата бетулина на активность каталазы в клетках печени представлено табл. 6.

Показатель активности фермента каталазы в печени возрастает на 8 % в стрессовой группе животных по сравнению с контрольной, а в печени опытной группы крыс возрастает на 20 % по сравнению со стрессовой группой.

Увеличение активности каталазы в печени стрессовой группы крыс показывает, что происходит накопление перекиси водорода, а это приводит к снижению активности СОД. Известно, что H_2O_2 является ингибитором СОД. Сниженный уровень супероксиддисмутазы в антиоксидантной системе приводит к увеличению супероксидных анион радикалов, которые могут взаимодействовать с пероксидом водорода, что влечет за собой образование более опасного гидроксильного радикала. Как известно, именно гидроксильный радикал инициирует процессы ПОЛ, что нами доказано по накоплению малонового диальдегида при окислительном стрессе.

Таблица 5. Содержание МДА в печени крыс

Условия эксперимента	Содержание МДА		
	0, мин	30, мин	60, мин
контроль (n=7)	346±7	453±9	390±4
стресс (n=7)	429±7 (p<0,001)*	1030±7 (p<0,001)*	398±8 (p<0,01)*
опыт (n=7)	416±8 (p<0,001)**	635±4 (p<0,001)**	394±3 (p<0,001)**

Примечание:

* – достоверность различий стресса по сравнению с контролем.

** – достоверность различий опыта по сравнению с параметром стресса.

Таблица 6. Содержание каталазы в печени крыс

Условия эксперимента	Содержание каталазы в печени, моль/мин г ткани
Контроль (N=7)	33,8±0,6
Стресс (N=7)	36,6±0,5 (p<0,01)*
Опыт (N=7)	43,9±0,4 (p<0,001)**

Примечание:

* – достоверность различий стресса по сравнению с контролем.

** – достоверность различий опыта по сравнению с параметром стресса.

Введение в инкубационную пробу диацетата бетулина вызвало увеличение активности каталазы и супероксиддисмутазы. По-видимому, диацетат бетулина способен (сам либо продукты его биотрансформации) стимулировать синтез антиоксидантных ферментов. Сравнительный анализ диацетата бетулина с дигидрохверцитином показал схожий результат. И в том и в другом случае наблюдается снижение накопления малонового диальдегида на 38 % [27].

Заключение

Разработан простой одностадийный способ синтеза диацетата бетулина из бересты коры березы, не требующий предварительного выделения бетулина и использования катализаторов этерификации.

Совмещением стадий экстракции бетулина из бересты коры березы и его этерификации ледяной уксусной кислотой удалось получить

продукт ацетилирования с выходом выше 43 % от массы а.с. бересты. С использованием методов элементного анализа, тонкослойной хроматографии, хромато-масс – спектрометрии, FTIR и ИК-спектроскопии изучен состав продукта ацетилиза бересты, в основном представленный диацетатом бетулина.

Изучены антиоксидантные свойства диацетата бетулина, проявляющиеся в его влиянии на количество МДА, на активность ферментов каталазы и СОД в печени и эритроцитах белых крыс, подвергнутых физической нагрузке (*in vivo*), а также изучено влияние диацетата бетулина на активности каталазы и супероксиддисмутазы и содержание малонового диальдегида в гомогенате печени в экспериментах *in vitro*.

На основании полученных данных по антиоксидантной активности диацетата бетулина можно предположить, что полученное

биологически активное соединение выступает в роли ловушки для активных форм кислорода, а также способно либо стимулировать синтез антиоксидантных ферментов – СОД и каталазы, либо непосредственно влиять на их активность.

Список литературы

1. Пастушенков Л.В., Лесновская Е.Е. Фармакология с основами фитотерапии. Ч. 2. СПб., 1995. С. 206-216.
2. Толстиков Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстиков А.Г. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность // Химия в интересах устойчивого развития. 2005. № 13. С. 1 – 30.
3. Василенко Ю.К., Семенченко В.Ф., Фролова Л.М. и др. Фармакологические свойства три-терпеноидов коры березы // Эксперим. и клин. фармакол. 1993. Т. 56. № 4. С. 53–55.
4. Патент РФ № 2276980, МПК А 61 К 31/56, А 61 Р 9/04. Капилляроукрепляющее средство. Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Лебедева А.Б., Веселова О.Ф., Пуликов А.С. Заявка № 2005105707/15. Заявлено 01.03.2005. Опубликовано 27.05.2006, БИ № 15.
5. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Толстиков Г.А., Толстиков А.Г., Флехтер О.Б. Терпеноиды ряда Лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы. Производные ряда Лупана // Биоорганическая химия. 2006. Т. 32, № 1. С. 42-55.
6. Кислицин, А. Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение // Химия древесины. 1994. №3. С. 3 – 28.
7. Похилло Н.Д., Уварова Н.И. Изопреноиды различных видов рода *Betulla* // Химия природных соединений. 1988. № 3. С. 325 – 341.
8. Патент РФ № 2264411 Российская Федерация, МПК 7 C07J 53/00,63/00. Способ получения бетулина / Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Михайлов А.Г., Левданский В.А.; № 2004122661/04; заявл. 23.07.2004; опубл. 27.11.2005, Бюл. № 33.
9. Флехтер О. Б., Карачурина Л. Т., Нигматулина Л. Р., Сапожникова Т. А.. Синтез и фармакологическая активность диникотината бетулина // Биоорганическая химия. 2002. Т. 28. № 6. С. 543 – 549.
10. 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.
11. Флехтер О.Б., Медведева Н.И., Карачурина Л.Т., Нигматулина Л.Р., Балтина Л.А., Зарудий Ф.С., Галин Ф.З., Толстиков Г.А. Синтез и противовоспалительная активность новых ацил-производных бетулина // Химико-фармацевтический журнал. 2005. Т. 39. № 8. С. 9 – 15.
12. Сымон А.В., Веселова Н.Н., Каплун А.П., Власенкова Н.К., Федорова Г.А., и др. Синтез циклопропановых производных бетулиновой и бетулоновой кислот и их противоопухолевая активность // Биоорганическая химия. 2005.Т. 31.№.1. С. 320 – 325.
13. Флехтер О.Б., Бореко Е.И., Нигматулина Л.Р., Павлова Н.И., Медведева Н.И., Николаева С.Н., Третьякова Е.В., Савинова О.В., Балтина Л.А., Карачурина Л.Т., Галин Ф.З., Зарудий Ф.С., Толстиков Г.А. Синтез и фармакологическая активность ацилированных оксимов бе-

- тулоновой кислоты и 28-оксо-аллобетулона // Химико-фармацевтический журнал. Т.38.№ 3. 2004. С. 31-34.
14. Patent US 7041701. Triterpenoid derivatives. 09.04.2006.
 15. Шелевич И.С., Рыбина А.В., Галин Ф.З., Талипов Р.Ф. Трансформация диацетата бетулина в различных средах. Тез. докл. IV Всерос. науч. конф. «Химия и технология растительных веществ». Сыктывкар. 2006. С. 453.
 16. Кислицин А.Н., Патласов В.П., Чупрова В.А. Способ получения диацетата бетулина. Патент РФ 2150473. 2000.
 17. Кузнецов Б.Н., Левданский В.А., Еськин А.П., Полежаева Н.И. Выделение бетулина и суберина из коры березы, активированной в условиях «взрывного автогидролиза». Химия растительного сырья. 1998. № 1. С.5 – 9.
 18. Krasutsky Pavel A., Carlson Robert M., Nesterenko Vitaliy V. Method for manufacturing betulinic acid. Patent US 6271405. 2001.
 19. Шарков В.И., Куйбина Н.И., Соловьева Ю.П. Количественный химический анализ растительного сырья. М.: Лесная промышленность. 1968. 59 с.
 20. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово. 2006. 556 с.
 21. Зайцев В.Г., Закревский В. И. Методологические аспекты исследований свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // Вестник Волгоградской медицинской академии. 1998. Вып.4. С. 49 – 53.
 22. Титова Н.М., Молокова Н.Н., Винник Ю.С. Диагностика окислительного стресса при остром панкреатите. Методические рекомендации. Красноярск, 2001. С.17 .
 23. Талакин Ю.Н., Гриднева Н.В., Иванова Л.А., Гайдаш И.А. Показатели перекисного окисления липидов у белых крыс. Гигиена и санитария. 1991. С. 58-62.
 24. Abuja P., Tatzber F. Monitoring oxidative stress and lipid peroxidation. Clinical laboratory Int. 2001. V. 7. P. 18 – 19.
 25. Колесова О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах. Лаб. дело. 1984. № 9. С. 540 – 546.
 26. Патент РФ № 2324700, Способ получения диацетата бетулинола. Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Редькина Е.С., Соколенко В.А., Скворцова Г.П.. Заявка № 2007101115/04(001177). МПК C07J 53/00 (2006.01.) Заявлено 09.01.2007
 27. Соколов С.Я., Тюкавкина Н.А., Олхир В.А., Лозинская А.И. Пат. РФ 2014841. Антиоксидантное, капилляропротекторное, противовоспалительное и антигистаминное средство. 1994.

Obtaining Betulin Diacetate from the Outer Birch Bark and Studying it's Antioxidant Activity

**Svetlana A. Kuznetsova^{a,b}, Natalia Yu. Vasil'eva^b,
Galina S. Kalacheva^c, Nadezhda M. Titova^b,
Evgenia S. Red'kina^a and Galina P. Skvortsova^a**

^a *Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS,
Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

^b *Siberian Federal University,
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia*
*Institute of Biophysics SB RAS
Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

The new method of betulin diacetate obtaining from the outer birch bark was suggested. This method combines stages of the betulin extraction from the bark by acetic acid and it's following eterification. The advanced method don't require preview of getting betulin and use of eterification catalysts. Antioxidantion activity of betulin diacetate has been studed in the experiments in vivo and in vitro.

Keywords: birch bark, betulin diacetate, obtaining, identification, antioxidant activity.
