

REFERENCES

1. Borzov S. M., Sheishenov Zh. O. Selective diagnostics of multitorch burning in industrial boiler units / Materials of the III All-Russian school-seminar "Energy saving — theory and practice." Moscow, September 21 – 29, 2006. P. 265 – 269 [in Russian].
2. Labusov V. A., Garanin V. G., Shelpakova I. R. Multichannel analyzers of atomic emission spectra: current state and analytical potentials / J. Anal. Chem. 2012. Vol. 67. N 7. P. 632 – 641.
3. Peisakhson I. V. Optics of spectral devices. 2nd edition. — Leningrad: Mashinostroenie, 1975. — 312 p. [in Russian].
4. Gaydon A. G. The spectroscopy of flames. — London: Chapman and Hall, 1957. — 279 p.
5. Borzov S. M., Garkusha V. V., Kozik V. I., et al. Selective diagnostics of burning processes in multitorch power units / Teplofiz. Aeromekh. 2006. N 2. P. 323 – 329 [in Russian].
6. Borzov S. M., Vas'kov S. T., Potaturkin O. I., Sheishenov Zh. O. Selective diagnostics of multiflame burning using simulation / Optoelectr. Instrument. Data Proc. 2008. Vol. 44. N 2. P. 118 – 124.
7. Warntz J., Maas U., Dibble R. W. Combustion. Physical and chemical fundamentals, modeling and simulation, experiments, pollutant formation. — Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. — 378 p.

УДК 661.12:543.552

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕТУЛИНА В ЭКСТРАКТАХ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© С. С. Калиева¹, Г. Б. Слепченко², Ю. А. Акенеев², Е. Е. Нурпейис²,
А. К. Ташенов¹, Е. А. Мамаева², А. А. Бакибаев³

Статья поступила 9 декабря 2016 г.

Методом вольтамперометрии на углеродсодержащих электродах установлена электрохимическая активность бетулина в водных растворах. Предложен способ идентификации бетулина по токам пиков окисления его активных функциональных групп и разработана методика его вольтамперометрического определения в растительных экстрактах в диапазоне $1 \cdot 10^{-6} - 8 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Получены вольтамперные кривые для сухих экстрактов бетулина, очищенных различными способами. Правильность результатов определения подтверждена методом «введено – найдено».

Ключевые слова: бетулин; вольтамперометрия; стеклоуглеродный электрод; окисление; определение.

Пентациклический тритерпеноид бетулин ряда лупана (луп-20(29)-ен-3 β ,28-диол) — кристаллическое органическое вещество, обладающее противоопухолевой, антиоксидантной, противовирусной и др. биологической активностью [1], — является основным компонентом экстракта внешней коры березы [2 – 4]. Структуру и содержание бетулина и его производных достоверно устанавливают с использованием современных физико-химических методов анализа (тонкослойная хроматография, инфракрасная спектроскопия, ЯМР ¹H и ЯМР ¹³C спектроскопия, хромато-масс-спектрометрия). Так в работе [5] проведена идентификация диацетата бетулина методом ЯМР-спектроскопии. Авторами работы [6] изучен состав экстракта бересты и идентифицирован бетулин с использованием метода хромато-масс-спектрометрии. Обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) проведены одновременно

экстракция и определение бетулина и бетулиновой кислоты из белой коры березы [7]. Из экстракта высушенного карпофора *Xanthoceras sorbifolia* Bunge хроматографическими методами был выделен и на основании спектральных данных идентифицирован бетулин [8].

Недостатками указанных методов являются высокая стоимость оборудования и расходных материалов, а также необходимость работы высококвалифицированного персонала. Следовательно, разработка новых, более чувствительных и селективных методов анализа до сих пор остается актуальной. В последнее время в качестве альтернативных физико-химических методов анализа органических веществ широкое применение получили электрохимические методы, в частности, вольтамперометрические, в том числе, инверсионная вольтамперометрия (ИВ). К преимуществам данного метода можно отнести экспрессность анализа, небольшие расходуемые количества образцов, простоту и дешевизну оборудования, отсутствие необходимости использования дорогостоящих реактивов [9].

На настоящий момент практически отсутствуют данные по электрохимическим (в том числе, вольтамперометрическим) способам определения пентацик-

¹ Евразийский национальный университет имени Л. Н. Гумилева, г. Астана, Казахстан.

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия.

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия; e-mail: miledi_2212@mail.ru

лических тритерпеновых соединений. Единственное упоминание в периодической научной литературе относится к вольтамперометрическому (ВА) определению бетулиновой кислоты (более растворимого в воде соединения, чем бетулин) на свинцовом пленочном электроде в щелочном фоновом электролите (0,02 М NaOH) [10].

Цель работы — исследование вольтамперометрического поведения бетулина на более простых в использовании углеродсодержащих электродах и возможности его определения в экстрактах растительного происхождения.

Оборудование и реактивы. Для измерений использовали аналитический вольтамперометрический комплекс СТА ТУ 4215-001-20694097-98 — компактный прибор, состоящий из электронного и измерительного блоков с тремя электрохимическими ячейками.

Деаэрирование и перемешивание анализируемых растворов в ячейке на стадии электролитического накопления осуществляли пропусканием газообразного азота с содержанием кислорода менее 0,001 %.

Для исследований вольтамперометрического поведения бетулина использовали «игольчатые» по форме индикаторные стеклогуглеродные электроды (СУЭ) площадью 60 – 80 мм² после предварительного электрохимического активирования их поверхности при анодных потенциалах (+1,1 – +1,2 В) в 0,1 М NaOH. Длительное использование данных электродов для вольтамперометрического определения бетулина в концентрациях 10⁻⁷ – 10⁻³ моль/л в водных электролитах показало, что чувствительность их со временем снижается (предположительно, из-за необратимой адсорбции бетулина и сопутствующих ему гидрофобных органических веществ). Вследствие этого потребовалась дополнительная очистка рабочей поверхности СУЭ после завершения серии ВА измерений: электрод обрабатывали смесью этанол-хлороформ в соотношении 3:1 непосредственно в ячейке анализатора (с барботированием азота) и в ультразвуковой ванне УЗВ-1/100 в течение 2 – 5 мин.

В качестве электрода сравнения использовали насыщенный хлоридсеребряный электрод («ЮМХ»), входящий в комплект вольтамперометрического комплекса СТА (Томск).

Для приготовления растворов использовали дистиллированную воду по ГОСТ 6709-72, перегнанную в присутствии 0,5 мл концентрированной серной кислоты и 3,0 мл 3 %-ного раствора перманганата калия на 1,0 л дистиллированной воды.

Фоновый электролит готовили следующим образом. Растворы дигидрофосфата и гидрофосфата натрия готовили растворением навесок 7,01 ± 0,01 г и 6,00 ± 0,01 г соответственно (в пересчете на сухую соль) реагентов $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ или $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ в бидистиллированной воде (500 мл). В дальнейшем использовали смеси дан-

ных растворов в соотношении (1:1), pH контролировали с помощью pH-метра.

Бетулин для исследований получали экстракцией из бересты по методу [11]. В колбу, снабженную обратным холодильником, помещали 10 г предварительно измельченной бересты, 300 мл этилового спирта и раствор щелочи, приготовленный растворением 18 г КОН в 70 мл воды. Реакционную массу кипятили при перемешивании в течение 4 ч, затем фильтровали от бересты. Фильтрат оставляли на ночь при температуре +4 – 6 °С. На следующий день выпавший осадок фильтровали, сырой осадок промывали дистиллированной водой до достижения показателя pH 7 промывных вод. Полученный сырец бетулина сушили при температуре 90 – 100 °С несколько часов. Оставшийся этанольный водно-щелочной раствор упаривали до половины первоначального объема, остаток охлаждали, выпавший повторно осадок бетулина отфильтровывали, промывали и сушили вышеуказанным способом. Сухие осадки объединяли. Получили сухой экстракт бетулина неочищенный (БН) массой 3,270 г, что в пересчете на сухую бересту составило 32,7 %. Часть экстракта БН была очищена хроматографическим методом — пропусканием его раствора в ацетоне через слой сорбента (оксида алюминия) и последующей отгонкой растворителя из собранных объединенных фракций, в результате чего после сушки получили сухой экстракт бетулина, очищенный на сорбенте (БОС). Другая часть экстракта БН была перекристаллизована из этанола: нерастворимые при кипячении растворителя вещества удаляли фильтрованием, а выпавшие затем из охлажденного раствора светлые кристаллы бетулина были отфильтрованы и подвергнуты сушке. Таким способом был получен образец сухого экстракта бетулина, очищенного перекристаллизацией (БОП).

Для приготовления рабочих растворов бетулина использовали образец БОС с содержанием основного вещества не менее 98 %, что было подтверждено методом хромато-масс-спектрометрии.

Поскольку бетулин практически не растворим в воде, после изучения литературных данных по растворимости бетулина и его производных в основных органических растворителях для приготовления рабочего раствора бетулина мы выбрали в качестве растворителя смесь хлороформа и этанола в соотношении 1:3. Использование данной смеси позволяет получать водно-органические смеси со значительным содержанием бетулина без расслоения или образования эмульсии (до $8 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Основной рабочий раствор $(1,80 \pm 0,08) \cdot 10^{-3}$ моль/л был получен путем растворения навески субстанции массой $0,020 \pm 0,001$ г в 25 мл смеси органических растворителей указанного состава.

Экспериментальная часть. На вольтамперограмме (рис. 1), полученной при исследовании электроокисления бетулина на СУЭ, наблюдаются три пика окисления с потенциалами 0,05, 0,45 и 0,72 В.

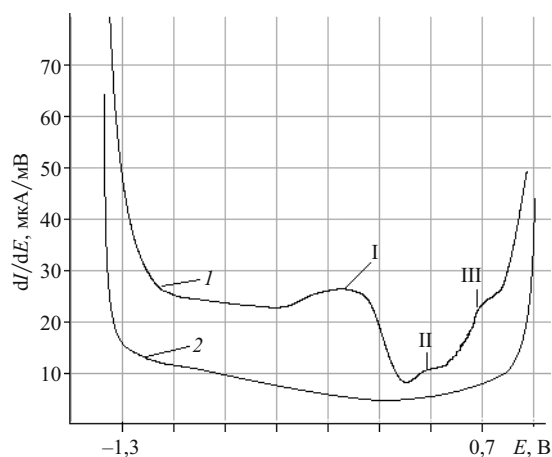


Рис. 1. Вольтамперограмма электроокисления образца бетулина БОС ($8 \cdot 10^{-5}$ моль/л): I — фоновый электролит; 2 — фоновый электролит с добавкой рабочего раствора бетулина (I, II, III — пики электроокисления бетулина)

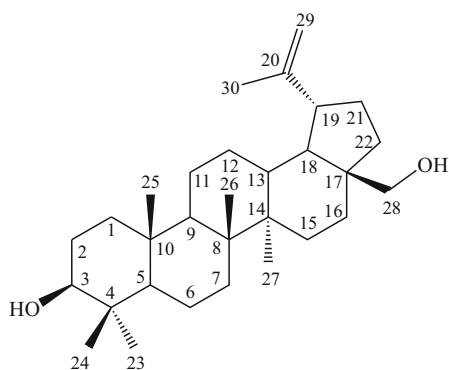


Рис. 2. Структурная формула бетулина

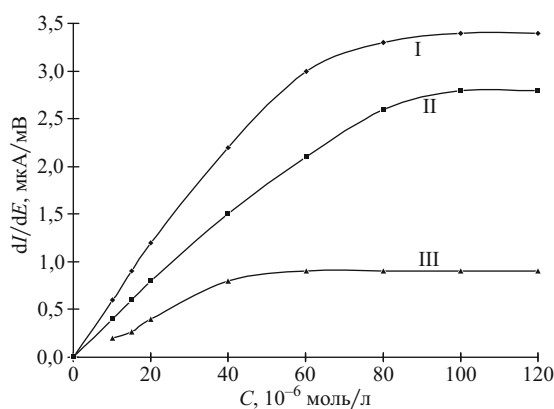


Рис. 3. Зависимость высот пиков (I — 0,05 В; II — 0,45 В; III — 0,72 В) окисления бетулина от его концентрации в растворе

Появление данных пиков электроокисления бетулина можно связать с возможностью окисления трех потенциально активных функциональных групп: $>C_{20}=C_{29}H_2$, $>C_3H-OH$, $-C_{28}H_2-OH$ (рис. 2) (размещены в порядке убывания предполагаемой электрохимической активности) [12].

Изучили зависимость высот пиков окисления бетулина от его концентрации в растворе (рис. 3). Установлено, что высоты I и II пиков линейно зависят от концентрации бетулина в достаточно широком диапазоне — от $1 \cdot 10^{-6}$ до $8 \cdot 10^{-5}$ моль/л, что можно использовать в аналитических целях.

Разработка методики определения бетулина методом ИВ. Изучили кинетику электронакопления бетулина (зависимость высоты пиков бетулина от потенциала и времени накопления), а также влияние pH среды. По полученным данным подобрали рабочие условия вольтамперометрического определения бетулина, которые приведены ниже:

Фоновый электролит	0,1 М Na_2HPO_4 + + 0,1 М NaH_2PO_4 , pH = 5,5
Удаление кислорода	Двухэлектродная
Используемая система	Потенциал электролиза (E_p), В -1,0
Диапазон развертки потенциалов (E_p), В	От -1,5 до +1,1
Скорость линейного изменения потенциала (w), мВ/с	30 – 40
Вид развертки	Линейный с дифференциальной регистрацией ВА-кривых
Потенциал регистрируемых пиков (E_p), В	0,05 ± 0,01 0,45 ± 0,01 0,72 ± 0,01
Время накопления, с	15 – 30

Перед анализом навески образцов экстрактов (БОС, БОП и БН) массой 20 мг растворяли в 10 мл смеси этанола и хлороформа (3:1). Кварцевый стаканчик объемом 10 мл с фоновым электролитом — фосфатным буферным раствором (0,1 М Na_2HPO_4 + 0,1 М NaH_2PO_4 , pH = 5,5) помещали в электрохимическую ячейку и погружали в раствор электрод сравнения и индикаторный электрод. Аликвоту пробы объемом 0,1 мл вносили в стаканчик с фоновым электролитом, раствор продували азотом.

Электронакопление и регистрацию аналитического сигнала проводили при указанных рабочих условиях: анодные пики бетулина регистрировали в диапазоне от 0,05 до 0,72 В на стеклоуглеродном электроде в дифференциальном режиме съемки вольтамперограмм. Концентрацию бетулина в пробе оценивали методом добавок, измеряя высоту анодных пиков.

Разработанная методика для ВА определения бетулина была применена для сравнения его содержания в образцах БОП и БН (рис. 4).

На рис. 4, а заметны все три пика, соответствующие окислению трех активных функциональных групп бетулина. На рис. 4, б наблюдаются пики при потенциале +0,05 и +0,45 В, но пик при потенциале +0,72 В отсутствует. С учетом того, что исследуемые растворы содержали одинаковые количества образца, можно считать, что общее содержание активных групп в образце БОП выше. Полученные ВА кривые показывают отличия, которые могут быть использова-

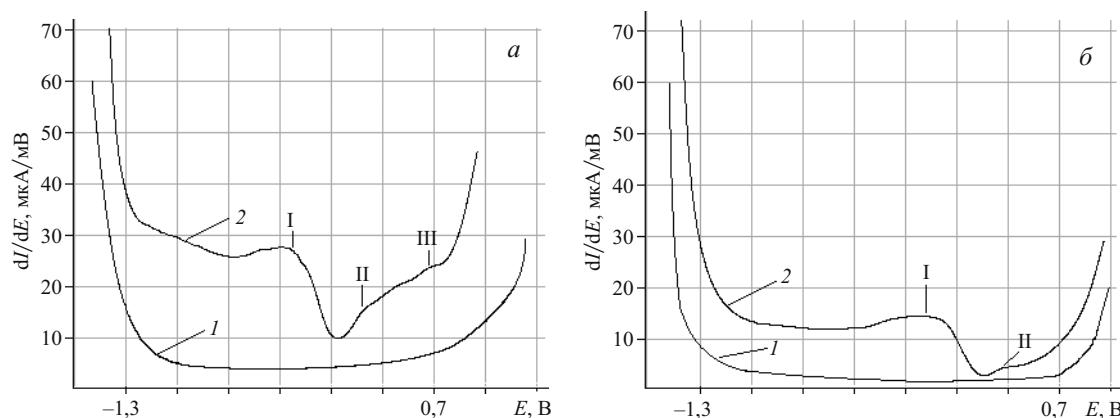


Рис. 4. Вольтамперограммы образцов БОП (а) и БН (б): 1 — фоновый электролит (фосфатный буферный раствор с pH = 5,5); 2 — добавка раствора бетулина

ны для идентификации образцов и сравнения содержания в них бетулина. Таким образом, можно идентифицировать образцы экстрактов различной чистоты и в дальнейшем провести количественную оценку содержания в них бетулина.

В таблице приведены результаты определения бетулина в образцах его неочищенного и очищенных разными способами сухих экстрактов, а также результаты проверки правильности определения методом «введено – найдено». Расчет концентрации бетулина проводили по I пику при потенциале +0,05 В.

Приведенные данные показывают, что в образцах БОП содержание бетулина меньше по сравнению с БОС примерно на 10 %, а в экстракте БН — на 15 %. При проверке правильности методом «введено – найдено» получены удовлетворительные результаты в приведенном диапазоне содержания бетулина, и среднеквадратичное отклонение не превышало 5 %.

Таким образом, в результате исследований установлена электрохимическая активность бетулина (способность к электрохимическому окислению) на углеродсодержащих электродах в водных растворах. Показана возможность его идентификации по токам пиков окисления активных функциональных групп бетулина и предложена вольтамперометрическая методика его определения в экстрактах растительного происхождения. Проведено определение бетулина в сухих экстрактах коры березы после очистки различными способами.

Разработанная методика отличается простотой реализации, экспрессностью, минимальным расходом реактивов и отсутствием органических фоновых электролитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tolstikov G. A., Flekhter O. B., Shultz E. E., et al. Betulin and its derivatives. Chemistry and Biological activity / Chemistry for Sustainable Development. 2005. N 3. P. 1 – 29.

Результаты определения бетулина в различных объектах методом «введено – найдено» ($m = 20$ мг; $n = 6$; $P = 0,95$)

Объект	Концентрация бетулина, мг/л		
	В растворе	Введено	Найдено
БОС	$19,4 \pm 0,9$	20	$41,2 \pm 2,5$
БОП	$17,5 \pm 0,9$		$38,8 \pm 1,9$
БН	$16,1 \pm 0,8$		$36,1 \pm 1,8$

2. Михайленко М. А., Шахтшнейдер Т. П., Брезгунова М. Е. и др. Получение и исследование физико-химических свойств сольватов бетулина / Химия растительного сырья. 2010. № 2. С. 63 – 70.
3. Левданский В. А., Полежаева Н. И., Левданский А. В., Кузнецов Б. Н. Изучение экстракции коры березы гексаном, этилацетатом, изопропиловым спиртом и водой / Химия растительного сырья. 2004. № 2. С. 17 – 20.
4. Ashavina O. Yu., Kabal'nova N. N., Flekhter O. B., et al. Oxidation of betulin and its acetates with dimethyldioxirane / Mendeleev Comm. 2004. Vol. 14. N 5. P. 221 – 223.
5. Кузнецова С. А., Васильева Н. Ю., Калачева Г. С. и др. Получение диацетата бетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантной активности / Журн. Сибирского фед. ун-та. Химия. 2008. Т. 1. № 2. С. 151 – 165.
6. Коптелова Е. Н., Кутакова Н. А., Третьяков С. И. Определение состава этанольного экстракта бересты / Изв. вузов. Лесной журнал. 2011. № 6. С. 107 – 111.
7. Zhao Guoling. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using PR-HPLC / J. Pharm. Biomed. Anal. 2007. Vol. 43. N 3. P. 959 – 962.
8. Li Wei, Li Xian, Li Zhan-lin, et al. Chemical components of *Carpophorus Xanthoceras sorbifolia* Bunge / J. Shenyang Pharm. Univ. 2005. Vol. 22. N 5. P. 345 – 347.
9. Zuman P. Past, present, and future of applications of electroanalytical techniques in analytical and physical organic chemistry / J. Solid State Electrochem. 2011. N 15. P. 1753 – 1759.
10. Tysczek-Rotko K., Wojciak-Kosior M., Sowa I. Voltammetric determination of betulinic acid at lead film electrode after chromatographic separation in plant material / Anal. Biochem. 2013. Vol. 436. N 2. P. 121 – 126.
11. Кузнецова С. А., Скворцова Г. П., Малай Ю. Н. и др. Выделение бетулина из бересты березы и изучение его физико-химических и фармакологических свойств / Химия растительного сырья. 2013. № 2. С. 93 – 100.
12. Flekhter O. B., Ashavina O. Yu., Smirnova I. E., et al. Selective oxidation of triterpene alcohols by sodium hypochlorite / Chem. Natur. Comp. 2004. Vol. 40. N 2. P. 141 – 143.

UDC 661.12:543.552

VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF BETULIN IN THE EXTRACTS OF PLANT ORIGIN

© S. S. Kaliyeva, G. B. Slepchenko, Yu. A. Akeneev, Ye. E. Nurpeiis,
A. K. Tashenov, E. A. Mamaeva, and A. A. Bakibaev

Submitted December 9, 2016.

The electrochemical activity of betulin (the ability to electrochemical oxidation) is determined by the method of voltammetry on carbon containing (glassy-carbon) electrodes in aqueous solutions. The suggested method of identification is based on measuring the values of currents corresponding to the oxidation peaks of active functional groups of betulin, their heights being linearly dependent on the betulin concentration within a range of 1×10^{-6} — 8×10^{-5} mole/liter. The developed voltammetric procedure provides betulin determination in plant extracts. Voltametric curves are obtained for dry extracts of betulin prepared using different purification procedures to demonstrate a possibility of betulin determination. The results are proved in spiking tests.

Keywords: betulin; voltammetry; glassy-carbon electrode; oxidation; methodology.

REFERENCES

1. Tolstikov G. A., Flekhter O. B., Shultz E. E., et al. Betulin and its derivatives. Chemistry and Biological activity / Chemistry for Sustainable Development. 2005. N 3. P. 1 – 29.
2. Mikhailenko M. A., Shakhtshneider T. P., Brezgunova M. E., et al. Preparation and research of physical and chemical properties of betulin solvates / Khim. Rastit. Syr'ya. 2010. N 2. P. 63 – 70 [in Russian].
3. Levanskii V. A., Polezhaeva N. I., Levanskii A. V., Kuznetsov B. N. Study of birch bark extraction with hexane, ethyl acetate, isopropyl alcohol and water / Khim. Rastit. Syr'ya. 2004. N 2. P. 17 – 20 [in Russian].
4. Ashavina O. Yu., Kabal'nova N. N., Flekhter O. B., et al. Oxidation of betulin and its acetates with dimethyldioxirane / Mendeleev Comm. 2004. Vol. 14. N 5. P. 221 – 223.
5. Kuznetsova S. A., Vasil'eva N. Yu., Kalacheva G. S., et al. Preparation of betulin diacetate from birch bark and study of its antioxidant activity / Zh. Sib. Fed. Univ. Khimiya. 2008. Vol. 1. N 2. P. 151 – 165 [in Russian].
6. Koptelova E. N., Kutakova N. A., Tret'yakov S. I. Determination of composition of the ethanol extract from birch bark / Izv. Vuzov. Lesn. Zh. 2011. N 6. P. 107 – 111 [in Russian].
7. Zhao Guoling. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using PR-HPLC / J. Pharm. Biomed. Anal. 2007. Vol. 43. N 3. P. 959 – 962.
8. Li Wei, Li Xian, Li Zhan-lin, et al. Chemical components of *Carpophorus Xanthoceras sorbifolia* Bunge / J. Shenyang Pharm. Univ. 2005. Vol. 22. N 5. P. 345 – 347.
9. Zuman P. Past, present, and future of applications of electroanalytical techniques in analytical and physical organic chemistry / J. Solid State Electrochem. 2011. N 15. P. 1753 – 1759.
10. Tysczuk-Rotko K., Wojciak-Kosior M., Sowa I. Voltammetric determination of betulinic acid at lead film electrode after chromatographic separation in plant material / Anal. Biochem. 2013. Vol. 436. N 2. P. 121 – 126.
11. Kuznetsova S. A., Skvortsova G. P., Malyar Yu. N., et al. Isolation of betulin from birch bark and study of its physicochemical and pharmacological properties / Khim. Rastit. Syr'ya. 2013. N 2. P. 93 – 100 [in Russian].
12. Flekhter O. B., Ashavina O. Yu., Smirnova I. E., et al. Selective oxidation of triterpene alcohols by sodium hypochlorite / Chem. Natur. Comp. 2004. Vol. 40. N 2. P. 141 – 143.