

# Betulina i jej pochodne

Andrzej Günther

**W** numerze 4/2016 Chemii w Szkole ukazał się artykuł „Amigdalina – jako wstęp do świata związków naturalnych” w którym opisano izolowanie amigdaliny [1]. Warto wzbogacić kolekcję związków naturalnych o kolejną substancję – betulinę, tym bardziej że surowiec jest łatwo dostępny.

Betulina (**1**), o dość skomplikowanej nazwie według systemu IUPAC, jest nazywana lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,28 $\beta$ -diolem, betulinolem lub alkoholem betulinowym. Betulinę zalicza się do triterpenów pentacyklicznych typu lupanu. Jak sama nazwa sugeruje, ich cząsteczki składają się z pięciu pierścieni: czterech sześciocłonowych (A–D, rys. 1) i jednego pięciocłonowego (E).

Betulina (**1**) została po raz pierwszy wyizolowana i opisana przez rosyjskiego chemika i farmaceutę niemieckiego pochodzenia, Tobiasa Lowitza w 1788 roku [2]. Występuje obficie w wielu gatunkach roślin i należy do najbardziej rozpowszechnionych substancji w naturze. Jednak największe jej stężenie, w przeliczeniu na suchą masę: 20–40%, znajduje się w zewnętrznej warstwie kory białych gatunków brzoź. To właśnie jej obecność sprawia, że kora tych drzew jest koloru białego. Można ją łatwo otrzymać na drodze ekstrakcji i krystalizacji z wykorzystaniem tanich rozpuszczalników organicznych, takich jak aceton, chloroform, metanol czy izopropanol. W takim ekstrakcie zawartość betuliny stanowi zwykle 70–80%, a reszta, to inne triterpeny, jak kwas betulinowy (**2**), którego zawartość może sięgać do 14%, allobetulina (**7**), aldehyd betulonowy (**5**) i lupeol (**3**) [2–4].

Pod względem chemicznym betulina jest związkiem aktywnym dzięki obecności dwóch grup hydroksylowych, tj. drugorzędowej przy atomie C-3 i pierwszorzędowej przy atomie C-28, oraz grupy izopropenylowej przy atomie C-19.

Innym wartościowym związkiem jest kwas betulinowy (**2**), o chemicznej nazwie kwas 3 $\beta$ -hydroksylup-20(29)-en-28-karboksylowy, występujący z betuliną w tych samych roślinach. Do wyjątków należy bobrek trójlistkowy (*Menyanthes trifoliata*), który jest rośliną bagienną, zawierającą wolny kwas betulinowy w podziemnych częściach [6].

Kwas betulinowy posiada grupę karboksylową przy atomie C-17 w miejscu grupy hydroksymetylowej w cząsteczce

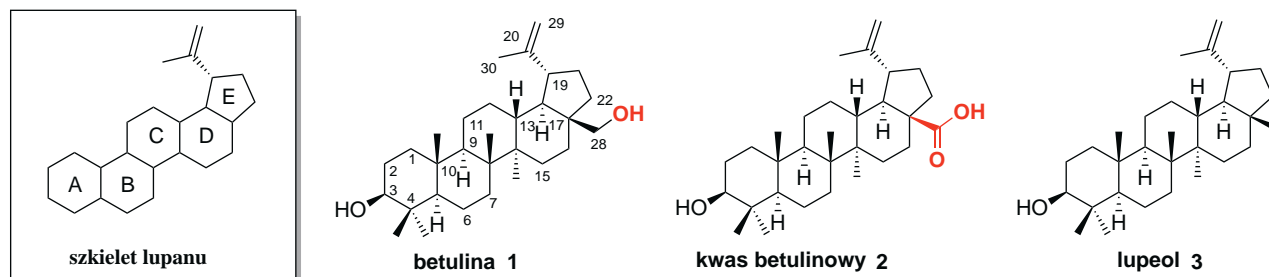
betuliny. Obydwa związki posiadają grupę hydroksylową w pozycji C-3. Oznacza to, że cząsteczki betuliny, jak i kwasu betulinowego ulegają podstawowym reakcjom: acylowaniu (dokładniej O-acylowaniu, prowadzącemu do otrzymania estrów i bezwodników kwasowych) oraz utlenianiu.

Najwygodniejsza i jak do tej pory najtańsza metoda otrzymywania kwasu betulinowego (**2**) polega na utlenianiu betuliny odczynnikami Jonesa (mieszanina CrO<sub>3</sub> w rozcieńczonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, w acetonie) w temperaturze 0 °C (rys. 2, A). Otrzymuje się kwas betulonowy (**4**), posiadający grupę ketonową przy atomie C-3 i karboksylową w pozycji C-28. Dalej poddaje się redukcji grupę ketonową w pozycji C-3 do grupy hydroksylowej, przy użyciu borowodoru sodu w tetrahydrofuranie, otrzymując kwas betulinowy (**2**) (rys. 2, B). Utleniając betulinę (**1**) kwasie octowym z dodatkiem CrO<sub>3</sub> otrzymuje się aldehyd betulonowy (**5**), z grupą ketonową w pozycji C-3, i aldehydową przy atomie C-28 (rys. 2, C). Uwodornienie wiązania nienasyconego w cząsteczce lupanów zachodzi podczas działania wodorem w obecności niklu Raneya, prowadzi ono do dihydro pochodnych przy atomie C-20, jak np., dihydrobetulina (**6**) (rys. 2, D). Cząsteczkę betuliny można modyfikować w obrębie nienasyconego łańcucha bocznego.

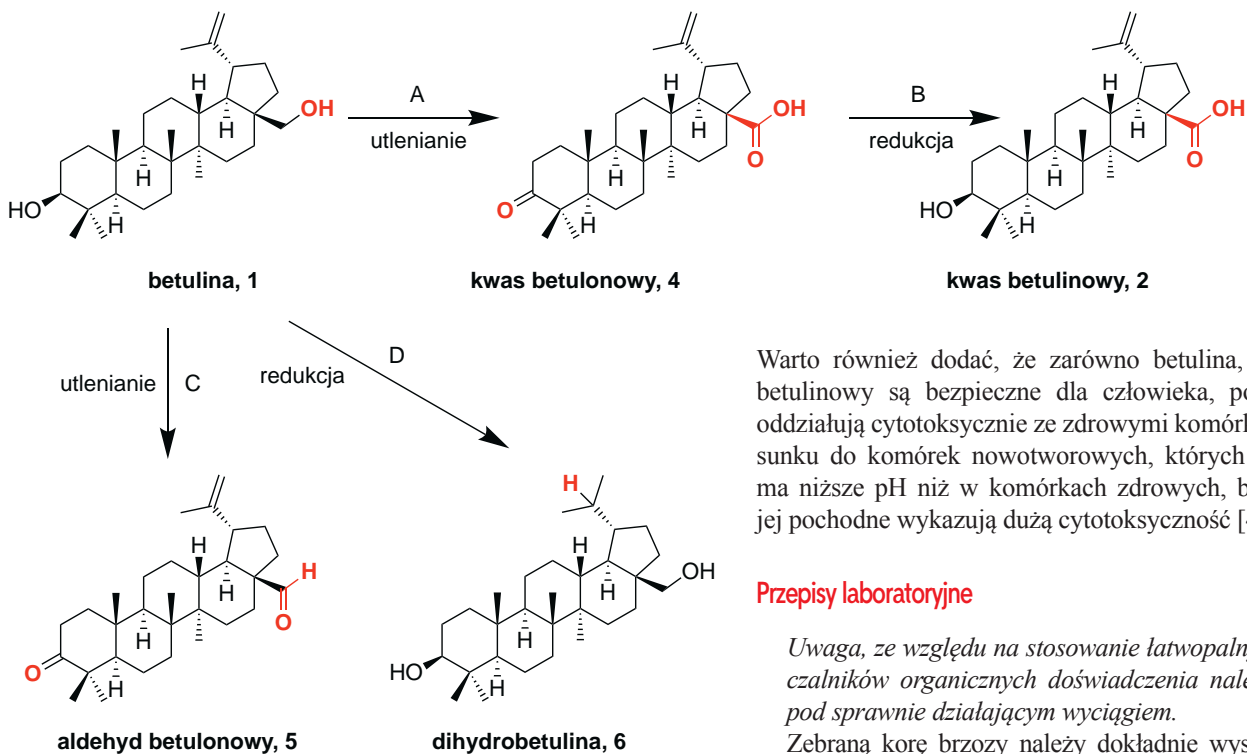
Betulina (**1**) ulega również reakcji przegrupowania do allobetuliny (**7**) pod wpływem stężonych kwasów jak np., HBr w chloroformie, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w kwasie octowym lub HCl w etanolu (rys. 3) [3, 5].

## Właściwości biologiczne

Stosowanie wyciągów z kory brzoź na różne dolegliwości było znane już od dawna, nawet rdzenni Amerykanie leczyli nim zaburzenia układu limfatycznego i gruźlicy [7]. Obecnie wyciągi z kory brzoźowej, jak i preparaty zawierające betulinę, znalazły zastosowanie w kosmetyce, głównie jako składniki szamponów wzmacniające cebulki włosów. Jednak zaczyna ją się cenić także ze względu na inne, interesujące i wielokierunkowe działanie biologiczne. Na szczególną uwagę zasługują właściwości przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe i przeciwzapalne. Odkryto, że betulina wywołuje apoptozę (programowalną śmierć) komórek nowotworowych jelita grubego, piersi oraz płuc [4, 6, 7].



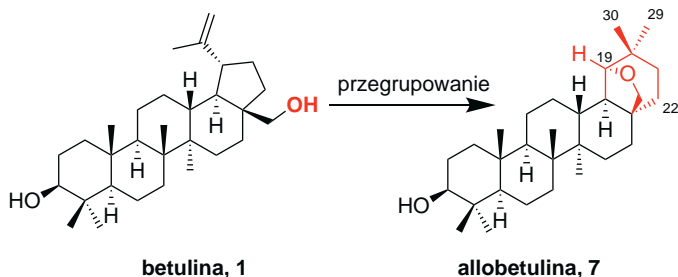
Rys. 1. Wzory strukturalne szkieletu lupanu, betuliny, kwasu betulinowego i lupeolu – głównych triterpenów zawartych w korze brzoźowej.



Rys. 2. Przykłady reakcji utleniania i redukcji betuliny; A –  $\text{CrO}_3$  w  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , w acetonie, temp.  $0\text{ }^\circ\text{C}$  – tzw., odczynnik Jonesa; B –  $\text{NaBH}_4$  w THF; C –  $\text{CrO}_3$  w kwasie octowym; D –  $\text{H}_2$ , Ni Raneya.

Najnowsze badania kliniczne wykazały, że betulina hamuje białko wiążące sekwencję odpowiedzi na sterole SREBP (ang. *Sterol regulatory element binding protein*), powodując spowolnienie biosyntezy cholesterolu i kwasów tłuszczowych. Obniża także zawartość lipidów w surowicy krwi i tkanek, zmniejsza i osłabia stabilność blaszki miażdżycowej oraz zwiększa wrażliwość na insulinę [9].

Niewielkie różnice w budowie cząsteczki mogą w bardzo dużym stopniu wpłynąć na jej aktywność biologiczną, czego przykładem jest kwas betulinowy (2), wykazujący największą aktywność biologiczną spośród triterpenów typu lupanu. Bardzo dużą uwagę naukowców na całym świecie skupiły doniesienia, że indukuje on proces apoptozy komórek czerniaka ludzkiego. Od tego czasu narasta zainteresowanie kwasem betulinowym. Odkryto również, że jego pochodne estrowe hamują cykl rozwojowy wirusa HIV w zainfekowanej komórce w początkowym stadium, chroniąc jednocześnie inne, niezainfekowane komórki.



Rys. 3. Przegrupowanie betuliny do allobetuliny pod wpływem stężonych kwasów.

Warto również dodać, że zarówno betulina, jak i kwas betulinowy są bezpieczne dla człowieka, ponieważ nie oddziałują cytotoksycznie ze zdrowymi komórkami. W stosunku do komórek nowotworowych, których cytoplazma ma niższe pH niż w komórkach zdrowych, betulina oraz jej pochodne wykazują dużą cytotoksyczność [4, 6, 10, 11].

## Przepisy laboratoryjne

*Uwaga, ze względu na stosowanie łatwopalnych rozpuszczalników organicznych doświadczenia należy wykonać pod sprawnie działającym wyciągiem.*

Zebrań korę brzozy należy dokładnie wysuszyć – np. drobno sproszkować i na tydzień pozostawić nad kaloryferem, umieścić w ciepłym piekarniku lub przez miesiąc suszyć w temperaturze pokojowej.

## Izolowanie betuliny z kory brzozej

### Metoda 1; Szybka, bez aparatu Soxhleta

#### Sprzęt:

- | kolba kulista o pojemności  $500\text{ cm}^3$ ,
- | chłodnica zwrotna,
- | lejek wraz z sączkiem,
- | czasza grzejna (lub łaźnia wodna)

#### Odczynniki:

- | wysuszona kora brzozy, ok. 50 g,
- | Alkohol etylowy (odbarwiony denaturat),  $200\text{ cm}^3$ ,
- | Alkohol izopropylowy (do krystalizacji, można zastąpić acetonem, metanolem lub etanolem),
- | 5% metanolewy lub etanolewy roztwór wodorotlenku sodu –  $50\text{ cm}^3$

Umieścić w kolbie okrągłodennej 50 g dokładnie wysuszonej kory brzozy i wlać  $200\text{ cm}^3$  etanolu (bezbarwnego denaturatu). Ogrzewać w stanie lekkiego wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 4 godziny. Następnie kolbę odstawić do następnego dnia (lub następnych zajęć). Odsączyć korę na lejku, a z ekstraktu oddestylować nadmiar alkoholu, do objętości ok.  $20\text{ cm}^3$ . Następnie dodać  $50\text{ cm}^3$  5% metanolewego roztworu wodorotlenku sodu i ogrzewać w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 10 godzin (lub z przerwami  $2 \times 5\text{ h}$ ). Po tym czasie mieszaninę odstawić na 12 godzin, najlepiej umieszczając ją w mieszaninie wody i lodu – lub lodówce. Osad odsączyć i przemyć dużą ilością wody. Tak otrzymaną betulinę należy wysuszyć. Otrzymuje się preparat w ilości ok. 11,50 g. Można go przekrystalizować z izopropanolu.

**Metoda 2; z wykorzystaniem aparatu Soxhleta****Sprzęt:**

- | Aparat Soxhleta
- | kolba kulista o pojemności 500 cm<sup>3</sup>,
- | lejek wraz z sączkiem,
- | czasza grzejna (lub łaźnia wodna)

**Odczynniki:**

- | wysuszona kora brzoźowa, ok. 50 g,
- | alkohol etylowy (odbarwiony denaturat) – 200 cm<sup>3</sup>,
- | alkohol izopropylowy (do krystalizacji, można zastąpić acetonem, metanolem lub etanolem),
- | 5% metanolewy lub etanolewy roztwór wodorotlenku sodu – 50 cm<sup>3</sup>

Umieścić 50 g dokładnie wysuszonej i sproszkowanej kory brzoźowej w aparacie Soxhleta i ekstrahować przy użyciu 200 cm<sup>3</sup> etanolu (odbarwionego denaturatu) przez 4 godziny. Następnie oddestylować nadmiar alkoholu do objętości ok. 20 cm<sup>3</sup> i dalej postępować wg metody 1. Otrzymuje się ok. 10 g betuliny w postaci białego krystalicznego proszku.

**Metoda 3; zalecana – z wykorzystaniem aparatu Soxhleta****Sprzęt:**

- | Aparat Soxhleta
- | kolba kulista o pojemności 500 cm<sup>3</sup>,
- | lejek wraz z sączkiem,
- | czasza grzejna (lub łaźnia wodna)

**Odczynniki:**

- | wysuszona kora brzoźowa, ok. 50 g,
- | heksan (frakcja z nafty) – 200 cm<sup>3</sup>,
- | alkohol etylowy (odbarwiony denaturat) – 200 cm<sup>3</sup>,
- | alkohol izopropylowy (do krystalizacji, można go zastąpić acetonem, metanolem lub etanolem),
- | 5% metanolewy lub etanolewy roztwór wodorotlenku sodu – 50 cm<sup>3</sup>

Umieścić 50 g dokładnie wysuszonej i sproszkowanej kory brzoźowej w aparacie Soxhleta i ekstrahować przy użyciu 200 cm<sup>3</sup> heksanu (frakcja z nafty) przez 50 godzin (z przerwami, np. 5x10 h). Ekstrakt heksanowy zawiera zanieczyszczony lupeol, który można otrzymać przez zateżnienie roztworu do ok 50 cm<sup>3</sup> i odstawienie do powolnej krystalizacji. Usunąć rozpuszczalnik z kolby i aparatu Soxhleta i wlać 200 cm<sup>3</sup> etanolu (odbarwionego denaturatu) i ogrzewać przez 4 godziny. Następnie oddestylować nadmiar alkoholu do objętości ok. 20 cm<sup>3</sup>. Dalej postępować wg metody 1. Otrzymuje się ok. 8,50 g betuliny w postaci białego krystalicznego proszku.

**Uwagi do powyższych przepisów.**

Opisane metody zostały dobrane z uwagi nie tylko na wyposażenie pracowni chemicznych, ale także na czystość betuliny. W metodzie pierwszej otrzymuje się betulinę z pewną ilością lupeolu, który można usunąć przez wygotowanie pod chłodnicą zwrotną z 10-20 cm<sup>3</sup> heksanu (frakcja z nafty). Następnie należy przekrystalizować betulinę z acetonu, etanolu, izopropanolu lub metanolu.

Może się okazać, że otrzymany produkt będzie silnie zabarwiony na kolor zielony, żółty lub inny, co oznacza, że jest zanieczyszczony – zawiera duże ilości olejków eterycznych, estrów, fenoli, tanin i innych związków. Należy wtedy ogrzewać betulinę w temperaturze wrzenia z kolejną porcją 50 cm<sup>3</sup> 5% metanolewego roztworu NaOH pod chłodnicą zwrotną przez 10 godzin. Dalej należy postępować jak w przepisie nr 1. Można również użyć do krystalizacji mieszaniny metanol:toluen (4:1) i następnie acetonu, jak opisał to Autor w swojej pracy doktorskiej [10].

W metodzie drugiej otrzymać można betulinę z niewielkimi ilościami lupeolu, który można usunąć przez krystalizację z mieszaniny metanol:toluen (4:1) i następnie z acetonu [10].

Metoda trzecia jest najdłuższa, ale najbardziej zalecana. W pierwszym etapie ekstrakcję prowadzi się w heksanie (frakcja z nafty), którego zadaniem jest „wymycie” zanieczyszczeń (woski, olejki eteryczne i inne) oraz lupeolu. Otrzymana na końcu betulina powinna zawierać jedynie śladowe domieszki lupeolu. Można ją przekrystalizować z mieszaniny metanol:toluen (4:1) i następnie z acetonu [10].

**Właściwości betuliny**

Betulina jest białym, krystalicznym proszkiem o temperaturze topnienia 256-257 °C, dobrze rozpuszczalnym w rozpuszczalnikach organicznych, w wodzie nierozpuszczalna. Wzór sumaryczny C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>, masa molowa 442,73 g·mol<sup>-1</sup>.

*Autor pragnie podziękować Koleżance dr Barbarze Bednarczyk-Cwynar za uchylenie drzwi do świata triterpenów.*

Mgr inż. Andrzej Günther

Katedra Chemii Organicznej i Chemii Fizycznej

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

**Literatura:**

- [1] Günther A., (2016) *Amigdalina – jako wstęp do świata związków naturalnych*. Chemia w Szkole nr 4,
- [2] Tolstikov G. A., Flekhter O. B., Shultz E. E., Baltina L. A., Tolstikov A. G., (2005) *Betulin and Its Derivatives. Chemistry and Biological Activity*. Chemistry for Sustainable Development 13 1–29,
- [3] Green, Brian; Bentley, Michael D.; Chung, Bong Y.; Lynch, Nicholas G.; Jensen, Bruce L. (2007), "Isolation of Betulin and Rearrangement to Allobetulin. A Biomimetic Natural Product Synthesis", *Journal of Chemical Education*, 84: 1985,
- [4] Periasamy G., Teketelew G., Gebrelibanos M., Sintayehu B., Gebrehiwot M., Karim A., Gere-medhin G., (2014) *Betulinic acid and its derivatives as anti-cancer agent: A review*. Archives of Applied Science Research, 6 (3):47-58,
- [5] Dehaen W., Mashentseva A. A., Seitembetov T. S., (2011) *Allobetulin and Its Derivatives: Synthesis and Biological Activity*. Molecules 16, 2443-2466
- [6] Zdzińska B., Szuster-Ciesielska A., Rzeski W., Kandefer-Szerszeń M., (2010) *Właściwości lecznicze betuliny i kwasu betulinowego, składników ekstraktu z kory brzozy (Therapeutic properties of betulin and betulinic acid, components of birch bark extract)*. Farmaceutyczny Przegląd Naukowy, 3, 33–39,
- [7] Bednarczyk-Cwynar B., Zaprutko L., (2003). Trójtterpenoidy w kosmetyce i kosmologii, *Triterpenoids in cosmetics and cosmetology*. Polish Journal of Cosmetology, 4: 218-240,
- [8] Tilford, Gregory L. (1997). *Edible and Medicinal Plants of the West*, Missoula, MO: Mountain Press
- [9] Jing-Jie T., i in. (2011). *Inhibition of SREBP by a Small Molecule, Betulin, Improves Hyperlipidemia and Insulin Resistance and Reduces Atherosclerotic Plaques*. *J. cmet.* 13 (1): 44–56,
- [10] Achrem-Achremowicz J., (2007). *Cytotoksyczność półsyntetycznych pochodnych betuliny*. Praca doktorska, Uniwersytet Jagielloński,
- [11] Bednarczyk-Cwynar B., Więcaszek T., Ruskowski P., (2016). *Cytotoxic Activity of Some Lupeol Derivatives*. *Natural Product Communications*, 2016, Vol. 11 (9).