Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Новосибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

Лигостаева Юлия Валерьевна

# Фармакогностическое исследование бересты и перспективы ее использования в медицине

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук,
профессор М.А. Ханина

Новосибирск – 2015

# ОГЛАВЛЕНИЕ


| | | Стр. |
|---|---|---|
| | **ВВЕДЕНИЕ** | **5** |
| **ГЛАВА 1.** | **СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ *BETULA PENDULA* ROTH. И *BETULA PUBESCENS* EHRH. И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)** | **12** |
| 1.1. | Ботанико-географическая характеристика *Betula pendula* Roth. и *Betula pubescens* Ehrh. | **12** |
| 1.2. | Химический состав бересты *Betula pendula* Roth. и *Betula pubescens* Ehrh. | **13** |
| 1.3. | Биологическая активность соединений, обнаруженных в бересте *Betula pendula* Roth. и *Betula pubescens* Ehrh. | **17** |
| 1.4. | Методы выделения экстрактивных веществ из бересты | **22** |
| 1.5. | Биологическая активность *Betula pendula* Roth. и *Betula pubescens* Ehrh. и применение их в медицине | **27** |
| | Список сокращений | **33** |
| **ГЛАВА 2.** | **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ** | **35** |
| 2.1. | Объекты исследования | **35** |
| 2.2. | Фармакогностические методы | **37** |
| 2.3. | Аналитические методы разделения биологически активных соединений | **40** |
| 2.4. | Препаративные методы разделения биологически активных соединений | **42** |
| 2.5. | Физические методы | **43** |
| 2.6. | Химические методы | **44** |
| 2.7. | Физико-химические методы | **45** |
| 2.8. | Методы количественного определения основных групп БАВ бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens* | **45** |
| 2.9. | Методы товароведческого анализа | **51** |
| 2.10. | Методы определения показателей качества | **51** |
| 2.11. | Получение сухого экстракта из бересты, измельченной классическим способом (КИ) и механохимической активацией (МХИ) | **52** |
| 2.12. | Методы фармакологических исследований | **52** |

| | | |
|---|---|---|
| 2.13. | Статистические методы | **56** |
| 2.14. | Стандартные образцы веществ сравнения (СОВС) | **56** |
| **ГЛАВА 3.** | **ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕРЕСТЫ (ЭКПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ)** | **57** |
| 3.1. | Общий фитохимический анализ бересты *Betula pendula* Roth. и *Betula pubescens* Ehrh. | **57** |
| 3.2. | Тритерпеновые сапонины | **58** |
| 3.3. | Кумарины | **64** |
| 3.4. | Полифенольные окисляемые соединения (дубильные вещества) | **69** |
| 3.5. | Гидроксикоричные кислоты | **75** |
| 3.6. | Аминокислоты | **81** |
| **ГЛАВА 4.** | **УСТАНОВЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОДЛИННОСТИ И КАЧЕСТВА БЕРЕСТЫ *BETULA PENDULA* И *BETULA PUBESCENS*** | **86** |
| 4.1. | Установление показателей подлинности | **86** |
| 4.1.1. | Габитус и внешние морфологические признаки *B. pendula* и *B. pubescens* | **86** |
| 4.1.2. | Микродиагностические признаки листа *B. pendula* и *B. pubescens* | **89** |
| 4.1.3. | Морфометрические диагностические признаки сырья – «Береста» | **103** |
| 4.1.4. | Микродиагностические признаки сырья – «Береста» | **103** |
| 4.1.5. | Качественные фитохимические реакции на основные группы БАВ | **107** |
| 4.2. | Установление показателей качества | **107** |
| 4.2.1. | Методика количественного определения тритерпеновых сапонинов | **107** |
| 4.2.2. | Методика количественного определения полифенольных окисляемых веществ (дубильных веществ) | **109** |
| 4.2.3. | Определение товароведческих показателей бересты *B. pendula* и *B. pubescens* | **111** |
| 4.3. | Установление сроков хранения сырья | **114** |
| **ГЛАВА 5.** | **МЕХАНОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ БЕРЕСТЫ** | **117** |
| 5.1. | Общий фитохимический анализ образцов КИБ и МХИБ | **118** |
| 5.2. | Анализ качественного состава и количественного содержания образцов КИБ и МХИБ | **118** |

| | | |
|---|---|---|
| 5.2.1. | Тритерпеновые сапонины | **118** |
| 5.2.2. | Кумарины | **119** |
| 5.2.3. | Полифенольные окисляемые соединения (дубильные вещества) | **122** |
| 5.2.4. | Гидроксикоричные кислоты | **124** |
| 5.2.5. | Аминокислоты | **132** |
| 5.2.6. | Исследование элементного состава | **135** |
| **ГЛАВА 6** | **УСТАНОВЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОДЛИННОСТИ И КАЧЕСТВА ОБРАЗЦОВ КИБ И МХИБ** | **137** |
| 6.1. | Установление показателей подлинности | **137** |
| 6.1.1. | Морфометрические диагностические признаки сырья – МХИБ | **137** |
| 6.1.2. | Микродиагностические признаки сырья - МХИБ | **137** |
| 6.1.3. | Качественные фитохимические реакции на основные группы БАВ | **138** |
| 6.2. | Установление показателей качества | **138** |
| 6.2.1. | Определение товароведческих показателей КИБ и МХИБ | **139** |
| 6.3. | Установление сроков хранения МХИБ | **140** |
| **ГЛАВА 7** | **ПОЛУЧЕНИЕ СУХИХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ БЕРЕСТЫ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ** | **141** |
| 7.1. | Подбор оптимальных технологических параметров для получения сухих экстрактов из бересты | **141** |
| 7.2. | Оценка острой токсичности | **147** |
| 7.3. | Оценка противовоспалительной активности сухого экстракта | **147** |
| 7.4. | Оценка гепатопротекторной активности сухого экстракта | **148** |
| | **ВЫВОДЫ** | **158** |
| | **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ** | **160** |
| | **ПРИЛОЖЕНИЕ** | **184** |

# ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Заболевания печени являются одним из ведущих видов патологии, не только в России, но и в мире. При этом разные категории больных имеют различную частоту и причины поражения печени [190].

К основным заболеваниям печени (гепатопатиям) относят: жировую инфильтрацию печени (капельки жира откладываются в гепатоцитах и повреждают их); острый гепатит (вирусная инфекция ведет к возникновению воспалительного процесса в гепатоцитах); хронический гепатит (часто возникают вследствие неизлечимого гепатита, вызванного вирусами, токсическими веществами); цирроз печени [80, 215].

Наиболее часто гепатопатии возникают при действии химических соединений – ксенобиотиков, которые делят на две группы. В первую группу входят вещества, проявляющие прямое токсическое действие на печень и организм в целом. Вторую группу составляют вещества, которые становятся токсичными в процессе их метаболизма, среди которых важное место занимают лекарственные препараты [219].

Лекарственные поражения печени являются одной из серьезных проблем в гепатологии. Насчитывается более 800 лекарственных средств, способных вызывать поражения печени [48, 190].

Считается, что выраженность токсического повреждения печени, а также механизмы ее возникновения определяются балансом между тремя основными факторами: степенью образования токсических метаболитов, механизмом их токсического действия, а также защитным потенциалом самой печени [106, 107].

Выраженными гепатозащитными средствами являются гепатопротекторы.

Гепатопротекторы – лекарственные средства, улучшающие метаболические процессы в печени, повышающие ее устойчивость к патогенным воздействиям, а также способствующие восстановлению ее функций при различных повреждениях [120].

Основные требования к идеальному гепатопротектору были сформулированы R. Preisig в 1970 г.: «высокая абсорбция, эффект «первого прохождения» через печень, способность предотвращать образование высокоактивных повреждающих соединений или связывать их, способность оказывать противовоспалительный эффект, антифибротические свойства, стимуляция регенерации печени, естественный метаболизм при патологии печени, экстенсивная энтерогепатическая циркуляция, отсутствие токсичности». Согласно этим требованиям конечной целью применения таких препаратов являются уменьшение воспалительных и дистрофических изменений в печени, усиление

репаративных процессов в гепатоцитах, ослабление фиброгенеза, уменьшение гистологических изменений ткани печени и как следствие - снижение риска формирования осложнения печеночных заболеваний [219].

В настоящее время существует большое количество гепатопротекторных препаратов, как природных, так и синтетических. В целом преобладающее использование имеют средства растительного происхождения – до 54%, на фосфолипидные препараты приходится до 16%, а на другие средства (синтетические, органопрепараты, препараты аминокислот) - до 30% от общего количества «истинных» гепатозащитных средств. Однако, несмотря на большое количество гепатопротекторных препаратов, использующихся в медицинской практике, ни один из них не удовлетворяет в полной мере требованиям «идеального гепатопротектора» [219].

С этой точки зрения к числу ценных источников биологически активных веществ перспективных для лечения и профилактики токсических поражений печени относится береста.

Береза повислая (*Betula pendula* Roth.) и береза пушистая (*Betula pubescens* Ehrh.) семейства березовых (*Betulaceae*) относятся к числу основных лесообразующих пород России и широко используются в промышленных целях. В результате окорки березовой древесины накапливается огромные количества бересты, которая не находит квалифицированного применения.

Исследования, проведенные отечественными и зарубежными учеными, показали, что береста и ее экстракты обладают широким спектром биологической активности: антиоксидантной [50, 54, 70, 87, 144, 169], антигипоксантной [70, 139, 169], противовоспалительной [63, 164], гиполипидемической [65, 144], противововирусной [57, 146, 162, 169], в том числе и гепатопротекторной [100, 186] .

Однако, несмотря на значительные сырьевые запасы, высокую биологическую активность, изученность химического состава тритерпеноидов береста находит применение только в народной медицине.

**Степень разработанности.** Объекты настоящего исследования ранее в химическом, хемотаксономическом, товароведческом, фармакологическом, технологическом отношениях исследованы недостаточно. Имеются публикации зарубежных и отечественных авторов, посвященные большей частью исследованиям тритерпеноидов бересты и методам повышения выделения бетулина. В литературе имеются разрозненные сведения о составе других биологически активных соединений гидрофильной фракции бересты. Ранее не были проведены сравнительные фитохимические исследования бересты двух

основных видов березы – березы пушистой и березы повислой, которые в основном и являются источниками бересты. В отечественной и зарубежной литературе не обнаружено сведений о влиянии механохимической активации на компонентный состав и выход биологически активных веществ из бересты. Наша работа позволила решить эти вопросы.

Учитывая выше изложенное, считаем целесообразным введение бересты в качестве нового вида лекарственного сырья. Для этого необходимо было решить целый ряд задач, чему посвящена настоящая диссертационная работа.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы является комплексное фармакогностическое исследование бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens* для обоснования возможности использования ее для разработки новых эффективных лекарственных средств для лечения и профилактики токсических поражений печени.

Для достижения поставленной цели необходимо решение следующих задач:

1. Проведение общего фитохимического анализа бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*.

2. Установление основных групп биологически активных веществ, разработка методик их количественного определения, проведение исследования динамики накопления действующих веществ в бересте.

3. Изучение влияния методов измельчения бересты на качественный состав и содержание основных групп биологически активных веществ.

4. Получение экстракта сухого из бересты и исследование его биологической активности.

5. Проведение анатомо-морфологических исследований для установления макро- и микроскопических признаков сырья – «Береста».

6. Установление показателей подлинности и доброкачественности лекарственного растительного сырья – «Береста».

7. Обобщение полученных данных и разработка проекта нормативного документа на бересту.

**Научная новизна.** Впервые проведено сравнительное фитохимическое исследование бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*, произрастающих в разных географических зонах.

Изучен состав гидроксикоричных кислот и кумаринов бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*, впервые установлено наличие кислоты хлорогеновой и кумарина.

Исследован качественный состав и количественное содержание суммы аминокислот в бересте *Betula pendula* и *Betula pubescens* в зависимости от места произрастания. Изучено влияние возраста бересты на накопление в ней БАВ.

Впервые установлено присутствие метионина, треонина, фенилаланина, триптофана, лизина, орнитина, аланина, серина, пролина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, глутамина.

Микроскопический анализ бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens* позволил установить микродиагностические признаки.

Установлено, что механохимическая активация бересты приводит к изменению качественного состава кумаринов, гидроксикоричных кислот, аминокислот; она способствует увеличению выхода большинства групп БАВ: тритерпеновых сапонинов, кумаринов, полифенольных окисляемых (дубильных) веществ и гидроксикоричных кислот.

В механохимически активированной бересте впервые выявлены кислоты: хлорогеновая и феруловая.

Проведено исследование влияния метода измельчения на элементный состав бересты и сухих экстрактов из них, полученных на 20 и 80% спирте этиловом. Установлено, что метод измельчения бересты не влияет на компонентный состав элементов, но оказывает значительное влияние на их содержание.

Впервые проведен микроскопический анализ механохимически активированной бересты и установлены ее микродиагностические признаки.

Определены оптимальные технологические параметры для получения сухих экстрактов из бересты, измельченной классическим способом и механохимически активированной бересты.

Скрининговые исследование противовоспалительной активности сухого экстракта, полученного из механохимически активированной бересты (экстрагент 20% спирт этиловый) (МХИБЭ20) свидетельствуют о его преимущественном влиянии на пролиферативную стадию воспалительного процесса.

Выявлена гепатопротекторная активность сухих экстрактов из бересты на различных моделях экспериментального токсического поражения печени. При этом активность МХИБЭ20 более выражена по сравнению с референтным препаратом – карсилом.

**Практическая значимость.** Данные о фитохимическом составе бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*, полученные в результате проведенных исследований, могут быть использованы при целенаправленном создании новых фитопрепаратов из бересты, а также для введения ее в официнальную медицину в качестве лекарственного растительного сырья.

Разработаны критерии, позволяющие установить подлинность сырья – «Береста», определены показатели его доброкачественности.

Предложены методики количественного определения суммы тритерпеновых сапонинов, дубильных веществ в бересте, которые введены в практику научных исследований и учебного процесса на кафедре фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава РФ, на кафедре фармакологии и фармацевтических дисциплин ГОУ ВО МО МГОГИ, на кафедре фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава РФ, на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава РФ. Разработанная методика количественного определения суммы аминокислот в бересте может быть использована при анализе других видов растительного сырья.

Результаты работы использованы при разработке проекта ФС на предлагаемый новый вид лекарственного сырья «Береста».

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.** Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований кафедры фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава РФ по теме «Поиск, изучение, создание и внедрение новых лекарственных средств растительного и синтетического происхождения и организационных форм фармацевтической деятельности» (№ государственной регистрации 012008074200) и комплексной целевой программой СО АМН Российской федерации «Здоровье человека в Сибири» (№ государственной регистрации 01.9.2002479).

**Методология и методы исследования**. Методология диссертационного исследования построена на изучении и обобщении литературных данных по теме исследования, оценке степени разработанности и актуальности темы. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан план выполнения всех этапов диссертационной работы; выбраны объекты исследования и подобран комплекс современных методов исследования.

Объектами исследования стали образцы бересты березы повислой и березы пушистой. В процессе исследования использованы фитохимические, аналитические, физические, физико-химические, морфологические и фармакологические методы анализа. Математическая обработка данных проводилась с использованием современных компьютерных технологий.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

**1.** Результаты сравнительного фитохимического анализа компонентного состава и количественного содержания основных групп БАВ бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens.*

**2.** Результаты анатомо-морфологических исследований.

**3.** Результаты определения параметров стандартизации бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens.*

**4.** Результаты изучения влияния методов измельчения бересты на компонентный состав и количественное содержание основных групп БАВ.

**5.** Результаты исследований биологической активности сухих экстрактов, полученных из бересты.

**Степень достоверности.** Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, являются обоснованными, достоверными и логически вытекающими из результатов эксперимента, что базируется на обширном фактическом материале, использовании современных методов анализа и подтверждается табличным материалом, рисунками и цифровыми фотографиями. Для обработки полученных результатов использовали программы: Waters Breeze2 Software, Bruker, IR SOLUTION. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы статистической обработки данных Statistica MS Excel. Для выявления статистической значимости различий использовали параметрический критерий Стьюдента.

**Апробация работы.** Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: V Всероссийской научной конференции с международным участием "Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2012 г.); III Российской (итоговой) научно-практической конкурс - конференции студентов и молодых ученых «АВИЦЕННА - 2012» (Новосибирск, 2012 г.); участие в школе молодых ученых «Наноуглеродные и наноалмазные материалы в электромагнитных и биомедицинских приложениях. Современные способы коммерциализации научных разработок» (с. Иогач, Республика Алтай, 2012 г.); финальном мероприятии по программе «У.М.Н.И.К. - 2013» в рамках научно-инновационного всероссийского ежегодного фестиваля «Факел» (Новосибирск,2013г.); Всероссийской конференции с международным участием «Молодые ученые – медицине» (аспирантские чтения 2013) (Самара, 2013 г.); 69 - ой Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (Екатеринбург, 2014 г.), Всероссийской научной конференции молодых ученых образовательных учреждений среднего и высшего фармацевтического образования «Использование разработок отечественных производителей в области современной энтеросорбции в формировании профессиональных компетенций по специальности «Фармация» (Москва, 2015 г.).

Победа в конкурсе и получение гранта правительства Новосибирской области (Новосибирск, 2013 г.).

**Публикации.** Основное содержание диссертации опубликовано в 14 научных работах, из них 5 статей – в журналах, входящих в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК».

**Экспериментальные исследования по теме диссертации выполнены** на кафедре фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)» Минздрава РФ; кафедре фармакологии ГБОУ ВПО НГМУ Минзрава РФ; кафедре медицинской химии ГБОУ ВПО НГМУ Минзрава РФ; кафедре патологической анатомии ГБОУ ВПО НГМУ Минзрава РФ; а также в сотрудничестве с коллективами других научных организации: Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск), ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии» (г. Новосибирск); Института химии твердого тела и механохимии СО РАН (г. Новосибирск); Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН (г. Новосибирск); ООО «Химико - аналитический центр «Плазма» (г.Томск). Сотрудникам данных подразделений выражаем искреннюю признательность и благодарность.

Особую признательность выражаем д.м.н., профессору О.Р. Греку, д.м.н., профессору В.И. Шарапову, к.м.н. М.А. Карпову, с.н.с. Т.Е. Алешиной, к.б.н. С.И. Байбородину, начальнику химико – аналитического отдела П.Н. Мирошникову.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной объектам и методам исследований, 5-ти глав собственных исследований, выводов, а также списка литературы, включающего 291 наименование, из которых 64 – зарубежных и приложение. Работа содержит 69 таблиц и 110 рисунков.

# ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ *BETULA PENDULA* ROTH. И *BETULA PUBESCENS* EHRH. И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1. Ботанико-географическая характеристика *Betula pendula* Roth. и *Betula pubescens* Ehrh.

Березовые леса занимают в России третье место после лиственничных и сосновых и представлены более 20 видами березы [168]. Наибольшую площадь из них занимают и имеют значительные сырьевые ресурсы два вида - береза повислая и береза пушистая [23, 60, 76, 271].

**Береза повислая** (бородавчатая, поникающая) **- *Betula pendula* Roth. ( *B. verrucosa* Ehrh., *B. talassica* Poljak.)** – листопадное дерево семейства березовых (***Betulaceae***) с мощной широкой кроной, высотой до 30 м. Кора гладкая, белая, легко расслаивающаяся, у старых деревьев при основании ствола – черная, с глубокими трещинами. Ветви повислые, молодые побеги красно-бурые, густо покрыты пахучими смолистыми железками. Почки клейкие, красно-бурые, с бальзамическим запахом и слегка вяжущим смолистым вкусом. Листья очередные, длинночерешковые, треугольно- или ромбически-яйцевидные, с широким клиновидным основанием, по краям двоякоострозубчатые, молодые – клейкие [28, 29, 74, 86, 92, 119, 124, 125,126, 165, 168, 182, 194, 195, 199, 200, 216].

Береза – дерево однодомное. Мужские (тычиночные) цветки собраны в соцветия – сережки, длиной 6-10 см, красно-бурого цвета, конечные, повислые, расположены кистью по 2-4, развивающиеся уже с осени. Женские (пестичные) сережки, длиной 2-4 см, имеют вначале бледно-зеленую окраску, а при созревании семян приобретают зеленовато-бурую, пазушные, одиночные, прямостоячие или отклоненные, развиваются весной вместе с листьями. Плод – односемянный плоскосжатый орешек с двумя перепончатыми крылышкам (крылатка), в 2-3 раза превышающими ширину плода [28, 29, 74, 86, 92, 119, 124, 125,126, 165, 168, 182, 194, 195, 199, 200, 216].

Цветет в апреле-мае, плодоносит в июле-августе. Размножается вегетативно (порослью) и семенами [165]. Продолжительность жизни березы – 100-120 лет [165].

**Береза пушистая (белая) - *Betula pubescens* Ehrh. (*B. alba* L., *B. krylovii* G. Krylov.)** отличается от березы повислой короткими, направленными вверх и в стороны ветвями, опушенностью молодых побегов и нижней листовой пластинки,

без бородавок и овально-яйцевидными, более кожистыми листьями и белым до самого основания стволом [29, 74, 124, 125, 126, 182, 199, 200, 216].

Береза повислая имеет обширный ареал: охватывает практически всю европейскую часть Российской Федерации (кроме Крайнего Севера), Западную и Восточную Сибирь, Северный Казахстан, Тарбагатай, Джунгарский Алатау, Западный Тянь-Шань и Кавказ. На востоке ареал березы повислой доходит до Байкала, единичные местонахождения отмечены значительно восточнее границы ее сплошного распространения - в бассейнах рек Лены и Алдана [92, 168, 199, 200].

Береза повислая образует чистые и смешанные леса в лесной и лесостепной зонах на сухих и влажных песчаных, суглинистых, черноземных и каменисто-щебнистых почвах, особенно много ее в речных долинах, образует первичные чистые и смешанные колки. В зоне смешанных лесов это основная лесообразующая порода [92, 124, 125, 126, 199, 200].

Береза пушистая имеет то же распространение, что и береза повислая, но встречается и на Дальнем Востоке на болотистых почвах [92, 124, 125, 126, 168, 198, 199, 200].

## 1.2. Химический состав бересты *Betula pendula* Roth. и *Betula pubescens* Ehrh.

Береста содержит различные группы биологически активных веществ: сапонины, дубильные вещества, эфирные масла, углеводороды, флавоноиды, кумарины, каротиноиды, терпеноиды [1], при этом основными компонентами являются производные пентациклического тритерпеноида – лупана [1, 30, 183, 238].

Анализ литературных источников показывает, что в зависимости от условий, мест произрастания и возраста растений, качественный состав и количественное содержание основных групп БАВ исследованных образцов бересты несколько отличается [1, 19], это особенно заметно в отношении тритерпеноидных соединений (в частности, содержание бетулина в бересте может варьировать в пределах от 10 до 40%) [1, 9, 20, 21, 26, 30, 31, 58, 61, 90, 99, 154, 179, 193, 208, 222].

Состав тритерпеноидов бересты ***B. pendula*** представлен следующими соединениями: бетулинол (78,1%), лупеол (7,9%), метиловый эфир бетулиновой кислоты (4,3%), эритродиол (2,8%), метиловый эфир олеаноловой кислоты (2,0%), бетулиновый альдегид (1,2%) [18, 58, 59, 71, 77, 91, 92, 191, 253, 271, 278, 280], на долю остальных тритерпеновых соединений приходится приблизительно 3,7% (28-моноацетат бетулина [18]), бетулиновая кислота [18, 77, 271, 92], ацетат бетулиновой кислоты [18, 92], лупенон [77], бетулоновый альдегид [77],

бетулоновая кислота [18, 77], кофеаты бетулинола [77, 147, 218] и бетулиновой кислоты [77], β-амирин [77, 218], олеаноловый альдегид [ 77, 184, 218], олеаноловая кислота [18, 77, 184, 271], 3 – оксоолеаноловая кислота [18], метилолеанолат [17, 77], ацетат [18, 77] и кофеат олеаноловой кислоты [77], лупан-3β,20-диол (моногинол) [77], лупан-3β,20,28-триол [77], кофеат лупан-3β,20,28, урсоловая кислота [18, 77, 92], ацетат урсоловой кислоты [18].

В бересте ***B. pendula*** также установлено присутствие фенольных соединений (флавоноидов, кумаринов, полифенольных окисляемых (дубильных) веществ, фенолкарбоновых (галловая), гидроксикоричных (хлорогеновая) кислот [92, 164] и более 60 элементов [164, 222]. Другой значимый компонент бересты – суберин, содержание которого может достигать 30-40% [17, 32, 91, 99, 155, 183, 188, 208, 222]. Субериновые кислоты представлены октадека – 19-ен-1,18 – диовой; октадекан – 1,18- диовой; 18-гидроксиоктадец-9-еновой; 9,16 – и 10,16 – дигидроксигексадекановой; 9,10-эпокси-18-гидроксиоктадекановой; 20-гидроксиэйкозановой; 9,10,18-тригидроксиоктадекановой; доказан-1,22-диовой; 22-гидроксидокозановая кислотами [77, 278]. В бересте обнаружены: целлюлоза (7,3%) [17,183, 208], трудногидролизуемые полисахариды (5,8%) [91, 183, 208], лигнин (13,4%) [17, 183, 208], пентозаны (3,1%), холоцеллюлоза (8,5%) [17, 19], стероиды (β-ситостерин, фитостерин) [58, 59], сесквитерпеноиды (α-сантален, α—транс-бергамотен, β-транс – бергамотен) [168, 211].

В углеводородном экстракте бересты ***B. pendula*** установлено присутствие высших жирных кислот и их производных - гексадекановая, линолевая, олеиновая, октадекановая, эйкозановая, генейкозановая, докозановая, трикозановая, тетракозановая, этиловый эфир олеиновой кислоты [18, 59].

В компонентном составе тритерпеноидных соединений бересты двух видов – ***B. pubescens*** и ***B. pendula*** значимых различий не обнаружено [1, 18, 77].

Исследование химического состава сухого экстракта бересты ***B. pubescens*** с использованием методов ГЖХ, ВЭЖХ, ИК- и ЯМР – спектроскопии позволило обнаружить следующие группы природных соединений: терпеноиды (75,2%), и их сложные эфиры (эфиры бетулинола и лупеола с жирными кислотами – 4,4%), эфирное масло (0,08%), углеводороды (6,3%), и их эпоксиды (1,0%), стероиды (β-ситостерин (2,7%), дубильные вещества (2,1%), флавоноиды (1,56% - в основном кемпферол, его 7-метиловый эфир, кверцетин, 4-метиловый эфир нарингенина), оксикумарины (0,85% - умбеллиферон, эскулетин) [1].

В результате препаративного хроматографического разделения фракций, содержащих тритерпеноиды и углеводороды, выделены в индивидуальном виде и идентифицированы следующие соединения: из терпеноидов – бетулинол,

изобетулинол, лупеол, лупенон, бетулоновый альдегид, бетулоновая кислота, бетулиновая кислота [1, 127], платановая кислота [1], а из углеводородов – α - сантален, α - транс-бергамотен, β - транс-бергамотен и их эпоксипроизводные [1].

Сведения о химическом составе бересты *B. pendula* и *B. pubescens* представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1

**Химический состав бересты *B. pendula* и *B. pubescens***

| Химический состав | Береста | |
|---|---|---|
| | ***B. pendula*** | ***B. pubescens*** |
| Тритерпеноиды лупанового, олеанового и урсанового типов | Лупеол [18, 58, 59, 71, 77, 92, 147, 271, 278], бетулин [18, 20, 23, 25, 26, 31, 58, 59, 60, 71, 77, 90, 92, 96, 99, 147, 155, 176, 183, 188, 193, 208, 271, 278], 28-моноацетат бетулина [18], бетулиновый альдегид [58, 71, 77, 92], бетулиновая кислота [18, 77, 92, 271, 278], ацетат бетулиновой кислоты [18, 92], метилбетулинат [71, 77], лупенон [77], бетулоновый альдегид [77], бетулоновая кислота [18, 77], кофеаты бетулинола [77, 147, 218] и бетулиновой кислоты [77] , β-амирин [77, 218], эритродиол [71, 77, 271], олеаноловый альдегид [77, 218], олеаноловая кислота [18, 77, 271], 3 – оксоолеаноловая кислота [18], метилолеанолат [71, 77], ацетат [18, 77] и кофеат олеаноловой кислоты [77], лупан-3β,20-диол (моногинол) [77], лупан-3β,20,28-триол [77], кофеат лупан-3β,20,28, урсоловая кислота [18, 77, 92], ацетат урсоловой кислоты [18] | Лупеол [1, 77, 271], бетулин [1, 77, 271], изобетулинол [1], бетулиновый альдегид [77], бетулиновая кислота [1, 77, 271], метилбетулинат [77], лупенон [1, 77], бетулоновый альдегид [1, 77], бетулоновая кислота [1, 77], кофеаты бетулинола [77] и бетулиновой кислоты [77], β-амирин [77], эритродиол [77, 271], олеаноловый альдегид [77], олеаноловая кислота [77, 271], метилолеанолат [77], ацетат и кофеат олеаноловой кислоты [77], лупан-3β,20-диол (моногинол) [77], лупан-3β,20,28-триол [77], кофеат лупан-3β,20,28, урсоловая кислота [77], аллобетулин и 3β-ацетил-11α,12α-эпоксиолеан-13,28-олид [77], платановая кислота [1]. |

| | | |
|---|---|---|
| Стероиды | β-ситостерин [18, 58, 59, 92], фитостерин [58] | β-ситостерин [1] |
| Высшие жирные кислоты | Гексадекановая, линолевая, олеиновая, октадекановая, эйкозановая, генейкозановая, докозановая, трикозановая, тетракозановая [18],этиловый эфир олеиновой кислоты [59] | |
| Сесквитерпеноиды | α-сантален, α-транс-бергамотен, β-транс – бергамотен [168, 211] | α - сантален, α - транс-бергамотен, β - транс-бергамотен и их эпоксипроизводные [1] |
| Полиэфиры | суберин [17, 19, 20, 23, 26, 31, 51, 58, 77, 96, 99, 152, 155, 183, 188, 193, 208, 278] | |
| Полисахариды | Целлюлоза [17, 96, 183, 208], пентозаны [17, 19, 152, 208,], холоцеллюлозы [17,19,152], трудногидролизуемые полисахариды [183,208] | |
| Полимеры | лигнин [19, 96, 152, 183, 208, 278] | |
| Элементы | минеральные вещества [17, 19, 152], 61 элемент [164, 222] | |
| Субериновые кислоты | октадека – 19-ен-1,18 – диовая кислота; октадекан – 1,18- диовая кислота [77]; 18-гидроксиоктадец-9-еновая кислота [77]; 9,16 – и 10,16 – дигидроксигексадекановая кислота [77]; 9,10-эпокси-18-гидроксиоктадекановая кислота [77, 278]; 20-гидроксиэйкозановая кислота [77]; 9,10,18-тригидроксиоктадекановая кислота [77, 278]; доказан-1,22-диовая кислота [77]; 22-гидроксидокозановая | |

| | | |
|---|---|---|
| | кислота [77] | |
| Фенолкарбоновые кислоты | галловая кислота [92] | |
| Гидроксикоричные кислоты | хлорогеновая кислота [92] | |
| Флавоноиды | | кемпферол, 7-метиловый эфир кемпферола, кверцетин, 4-метиловый эфир нарингенина [1] |
| Кумарины | | умбеллиферон, эскулетин [1] |

## 1.3. Биологическая активность соединений, обнаруженных в бересте *Betula pendula* Roth. и *Betula pubescens* Ehrh.

### 1.3.1. Полифенольные окисляемые соединения (дубильные вещества)

Полифенольные окисляемые соединения обладают широким спектром биологической активности [122]. Они оказывают антиоксидантное [12, 231, 232, 234, 270], противовоспалительное [122, 232 ,234], ранозаживляющее [232], противоязвенное [232], противоопухолевое (подавляют метастазирование, запускают противораковые химические процессы) [258, 282], противодиарейное, гемостатическое, антигеморроидальное [240], противовирусное (ингибируют вирус ВИЧ-1 gp 41 инфекции) [288], антибактериальное (эффективны в отношении Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhy, Streptococcus pyrogens, Escherichia coli) [230, 252], антипаразитарное (эффективны в отношении возбудителей лейшманиоза) [264, 268] действие. Для данной группы биологически активных соединений отмечена также гепатопротекторная активность, при этом значительно снижается уровень глюкозы и липидов в сыворотке крови, что может использоваться для нормализации нарушений липидного обмена и предотвращения развития сердечно-сосудистых заболеваний [242].

### 1.3.2. Гидроксикоричные кислоты

В природе наиболее распространены кофейная кислота и ее производные (хлорогеновая и ее изомеры), оказывающие противовоспалительное и желчегонное действие. Совместно кофейная, хлорогеновая, феруловая, кумаровая кислоты оказывают гипоазотемический эффект, усиливают функцию почек, стимулируют антитоксическую функцию печени [122].

Хлорогеновая кислота проявляет антиоксидантную, противовоспалительную [233, 246, 257], антиканцерогенную, анальгезирующую, жаропонижающую [257], антибактериальную [263], антитромбоцитарную активность [247], а также оказывает гипогликемическое и гиполипидемическое действие [281].

### 1.3.3. Кумарины

Кумарины проявляют разностороннюю биологическую активность: противовоспалительную, антиоксидантную [235, 259, 286], антикоагулянтную [102, 122, 260, 267], иммуномодулирующую, противоопухолевую [122, 237, 286], антиаллергическую [5], антиаритмическую [11, 243], а также известны коронарорасширяющие, β-блокирующие [286], желчегонные [287], гипотензивные [224] свойства кумаринов.

Многие фурокумарины обладают фотосенсибилизирующей способностью [102, 224] и спазмолитической активностью [11 , 236].

Ряд кумаринов и фурокумаринов проявляют бактериостатическое свойства в отношении Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi, Shigella dysenteriae, Bacillus cereus, Corynebacterium, Staphylococcus aureus и Streptococcus pyogenes бактериальных штаммов и противогрибковую активность в отношении Trichophyton longifusus, Candida albicans, Aspergillus flavus, Microsporum canis, Fusarium solani, Candida glaberata [102, 122, 262]. Имеются литературные данные о анти – ВИЧ активности некоторых синтетических и производных природных кумарина [102, 269, 286]. Собственно кумарин (лактон цис-о-гидроксикоричной кислоты) эффективен при некоторых видах лимфедемы [102, 245], почечной карциноме [102, 241] и меланоме [102, 275].

### 1.3.4. Аминокислоты

Все аминокислоты являются α-аминокислотами L-ряда. Исключение составляет фенилаланин, который может иметь dl-форму [68, 225].

Аминокислоты и их комплексные препараты обладают широким спектром фармакотерапевтической активности [108]. Для работы мозга и центральной нервной системы особо важны триптофан, глицин, глутаминовая кислота [95, 108] и тирозин [68]; для работы сердечно-сосудистой и системы кроветворения – лизин, аргинин, метионин [68]. Аргинин замедляет рост опухолей, в том числе раковых, за счет стимуляции иммунной системы организма [68, 109]. Изолейцин необходим для синтеза гемоглобина, стабилизирует и регулирует уровень сахара [68]. Триптофан участвует в образовании в организме витамина PP [185]. Лизин,

треонин, фенилаланин, тирозин, аспарагин, глутамин, глицин, серин, аргинин являются исходными веществами для синтеза антител, гормонов, ферментов и других веществ. Они участвуют в метаболизме сахаров и органических кислот (аланин), способствуют снижению уровня холестерина в крови (метионин, триптофан, лизин, аргинин), выведению тяжелых металлов из организма (метионин, цистеин), росту и восстановлению тканей (гистидин, изолейцин, лейцин, глицин, серин, пролин).

α-Аминокислоты могут служить источником энергии на клеточном уровне (валин, лейцин, изо-лейцин, глутамин). Серусодержащие аминокислоты (метионин, цистеин) являются донорами серы, которая предотвращает нарушения формирования волос, кожи и ногтей. Они также играют важную роль в создании вторичной структуры белков за счет образования дисульфидных мостиков [42, 67].

Метионин применяется для лечения и предупреждения заболеваний и токсических повреждений печени, при хроническом алкоголизме и диабете, обладает липотропным действием [108].

Все выше изложенное свидетельствует о большой практической значимости изучения содержания в растениях аминокислот, которые могут быть использованы в комплексной терапии различных заболеваний.

### 1.3.5. Макро- и микроэлементы

Основным биологическим аккумулятором минеральных веществ являются растения [101].

В растениях обнаружено свыше 76 химических элементов, их классифицируют на макро- и микроэлементы, ультра-микроэлементы [22, 181, 205].

Установлено, что немаловажную роль в проявлении лекарственных свойств растений играет минеральный комплекс [112, 220, 221]. Мощное воздействие микроэлементов на физиологические процессы объясняется тем, что они входят в состав так называемых акцессорных веществ: дыхательных пигментов, витаминов, гормонов, ферментов, а также коферментов, участвующих в регуляции жизненных процессов. Микроэлементы влияют на направленность действия ферментов и их активность. Это дало основание известному российскому ученому-агрохимику А.В. Петербургскому назвать микроэлементы катализаторами катализаторов [160].

Микроэлементы участвуют в таких важнейших биохимических процессах, как дыхание (медь, цинк, марганец, кобальт), синтез белков (марганец, кобальт, медь, никель, хром), кроветворение (кобальт, медь, марганец, никель, цинк), белковый, углеводный и жировой обмен веществ (молибден, ванадий, кобальт,

вольфрам, марганец, цинк) [174,179] и требуются человеку лишь в оптимальных количествах [160].

Дефицит макро- и микроэлементов способен вызвать развитие патологического процесса в организме человека [133, 221]. Поэтому сведения о химическом составе лекарственных растений необходимы для разработки на их основе суммарных препаратов, используемых для профилактики и лечения заболеваний, связанных с дисэлементозами [112, 205].

### 1.3.6. Тритерпеновые соединения, суберин, лигнин бересты

Основными химическими компонентами бересты являются собственно экстрактивные вещества (представленные в основном тритерпеновыми сапонинами), суберин и лигнин [77]. В 1788 г. Т. Е. Ловиц из березовой коры путем сублимации выделил соединение, которое Мэзон в 1831 г. назвал бетулином (от лат. betula — береза) [77]. Суберин (от лат. suber – пробковое дерево) – такое название дал Бусиньоль в 1836 г. веществам, извлеченным из коры пробкового дерева *Quercus suber* спиртовой щелочью [77].

По содержанию биологически активных тритерпеновых соединений береста является рекордсменом среди других видов растительного сырья [71, 183]. Общее содержание их достигает 315 г/кг в пересчете на абсолютно сухое сырье [71].

Массовая доля бетулина (бетулинола) в бересте колеблется в очень широких пределах (от 10 до 40%) в зависимости от вида березы, места и условий произрастания, возраста дерева и других факторов [9, 31, 71, 77, 158, 174, 183, 227, 265]. Установлено, что климатические условия произрастания деревьев *B. pendula*, определяемые географической зональностью, оказывают незначительное влияние на содержание бетулина и суберина в бересте [20], но при ухудшении экологических условий - увеличении интенсивности промышленного загрязнения выявлено постепенное возрастание их содержания [21,193].

Доступность и биологическая активность бетулина ставит его в ряд перспективных ценных природных соединений [9, 31, 71].

Бетулин обладает широким спектром биологической активности: гастропротекторной [30, 31, 88, 158, 183], противоязвенной [183], антисептической [30, 71, 271], антивирусной (вирус герпеса и Эпштейн-Барра, является анти–ВИЧ-агентом [30, 71, 191, 218, 271, 272], противовоспалительной [30, 218, 271, 280], гепатопротекторной [30, 31, 158, 218, 271], антиоксидантной [30, 62, 71, 183, 218, 280], капилляроукрепляющей [30], желчегонной [218], противомикробной (туберкулостатической, проявляющаяся в ингибировании развития микобактерий) [191, 218], противоопухолевой (эффективен против саркомы Уолкера 256, аденомы

грудной железы MCF-7 in vitro и лейкемии P 388 in vivo, эпидермоидной канцеромы носоглотки in vitro) [31, 71, 77, 163, 172, 191, 218, 271, 274, 283].

Установлено, что бетулин не проявляет токсичных свойств и относится к 4 классу малотоксичных веществ (среднелетальная доза бетулина (ЛД50) составляет 9000 мг/кг). [58, 183].

Бетулин не обладает аллергенным, канцерогенным, кожнораздражающим, кумулятивным, мутагенным, сенсибилизирующим и эмбриотоксическим действием. Он рекомендован Министерством здравоохранения и социального развития РФ в качестве БАД. Адекватный уровень потребления бетулина состаляет 40 мг/сут [9].

Сам бетулин и некоторые его эфиры используются в качестве эффективных эмульгаторов водо-мясляных смесей [77, 183].

Бетулин также может применяться для синтеза новых классов биологически активных соединений, содержащих бетулиновый фрагмент [177, 183].

В настоящее время синтезировано более 240 производных бетулина, обладающих ценными свойствами, в том числе аллобетулин [96], бетулиновая кислота, аминопроизводные, серосодержащие соединения и сложные эфиры бетулина [25, 163, 177].

Например, диацетат бетулина проявляет противоопухолевую [77, 175], антиоксидантную [152] активность, аллобетулин обладает выраженной противовирусной активностью [175, 177].

Противовирусная активность производных лупановых тритерпеноидов сочетается с выраженным иммуностимулирующим действием. Так, диникотинат бетулина стимулирует выработку антителобразующих клеток, способствует восстановлению уровня маркерных ферментов сыворотки крови, щелочной фосфатазы и билирубина. Кроме того, данное соединение уменьшает интенсивность процесса перекисного окисления липидов в 1,8 раза и обладает тем самым антиоксидантными свойствами. Высокая гепатопротекторная активность превосходит активность официально разрешенного препарата «Silibinin». Диникотинат бетулина предотвращает развитие лучевой болезни [174, 178, 179, 284], проявляет гепатопротекторную, противоязвенную, противовоспалительную, ранозаживляющую, анти-ВИЧ активность [130, 178]. Исследование фармакологических свойств бисгемифталата бетулина установило его гепатопротекторную, антиоксидантную, иммунотропную активность [73, 130].

Диглицидиловый эфир бетулинола предложен в качестве мономера для получения эпоксиполимеров с высокими диэлектрическими свойствами [7, 77].

Эфир пальмитиновой кислоты бетулинола испытан в качестве пластификатора поливинилхлорида [223].

Бетулиновая кислота и ее производные проявляют противораковую активность (подавляет рост меланомы и карциномы толстой кишки) [71, 77, 150, 183, 244, 251, 271], противоопухолевую [150, 180, 280, 239, 248, 251], противовирусную (подавляют вирус ВИЧ – инфекции) [150, 183, 229, 239, 248, 271, 272, 285, 280], антибактериальную [150, 271, 280], противовоспалительную [77, 150, 248, 271, 280], бронховазодиляторную, антиплазмодийную [150, 248, 280], гепатопотекторную активность [271] и рецепторное действие [191].

Лупеол и его производные являются активными цитостатиками и проявляют антибактериальные свойства [77, 191]. Субериновые кислоты показали значительную противогрибковую активность против *Aphanoyces euteiches* [77].

Соединения на основе суберина и лигнина могут применяться в других отраслях народного хозяйства. Например, борсодержащие защитные композиты на основе суберина и лигнина могут быть применены для комбинированной био- и огнезащиты древесины и древесных строительных материалов [51, 189]. Установлена возможность получения на основе суберина пленкообразующих материалов [32] и приготовление на основе лигнина компостов для повышения плодородия почв и урожайности сельскохозяйственных культур [91].

## 1.4. Методы выделения экстрактивных веществ из бересты

Впервые бетулин из бересты выделил Т. Е. Ловиц методом сублимации, при этом он был сильно загрязнен и выход его был невелик, позже были получены результаты при вакуумной (давление 1,3 - 1,8 кПа) сублимации бетулинола из бересты, предварительно обработанной кипящими водными растворами щелочи. Выход сублимата составил 23 % [77].

Pasich J. [77] исследовал процесс извлечения экстрактивных веществ бересты в аппарате Сокслета и нашел, что наибольший выход достигается при использовании трихлорэтилена (44%) по сравнению с бензолом, диэтиловым эфиром и хлороформом (28, 25, 22% соответственно). Он же попытался интенсифицировать процесс экстракции с помощью ультразвука, но не получил положительных результатов.

Jaasketainen P. [265] изучил кинетику и глубину извлечения экстрактивных веществ бересты рядом растворителей и установил, что имеется тенденция увеличения скорости и глубины экстракции с ростом «полярности» растворителя [77, 265].

Основательно изучен процесс извлечения бетулинола из бересты Ч. Эккерманом и Р. Экманом (Eckerman Ch., Ekman R.) [253], было установлено, что скорость и полнота экстракции напрямую зависит от размера частиц бересты - при использовании бересты мелкого помола (размер частиц 0,15 - 1,5 мм) происходит более быстрое растворение бетулинола, чем из бересты с размером частиц 0,8 - 4,0 мм [77].

Были предложены и другие методы выделения бетулина:

1. В соответствии с [261] березовую кору экстрагировали бензолом при нагревании, выделившийся при охлаждении экстракта бетулин отфильтровывали и сушили.

2. Последовательная экстракция измельченной коры петролейным эфиром, четыреххлористым углеродом и хлороформом [266].

3. Многостадийный метод выделения бетулина из коры березы, включающий экстракцию трихлорэтиленом, прямое ацелирование экстракта и гидролиз диацетата бетулина [279].

4. Измельчение коры в присутствии щелочи и изопропилового спирта при 60 -70 ºС [8].

5. При экстракции водно-этанольными растворами гидроксида натрия и гидроксида калия с концентрацией щелочи от 10 до 25% - получены бетулинсодержащие продукты с выходом около 40% и содержанием в них бетулина 74-75 и 85-89% соответственно [30].

6. Метод тонкопленочной парофазной экстракции бересты - установлены основные закономерности влияния природы легкокипящего компонента экстрагента на состав, степень экстракции и форму получаемых экстрактов. Показано, что интенсификация процесса экстракции обуславливается проведением процесса в тонком слое при орошении слоя бересты конденсатом экстрагента, а также за счет повышенного градиента концентраций экстрактивных веществ в системе экстрагент – береста [71].

7. Разработаны способ и аппаратура для получения экстрактов терпенов и кристаллического бетулина из гранулированной бересты (фракция 0,4-2,0 мм), экстрагируя петролейным эфиром (интервал кипения 100 – 140 ˚С) при температуре кипения. Процесс экстракции проводится в проточном реакторе в режиме интенсивной массопередачи в потоке перегнанного растворителя. Выход в виде очищенных кристаллов бетулина 40-50% от общего количества экстрактивных веществ с общей концентрацией бетулина-лупеола 90-93% от общей массы абсолютно сухих кристаллов [238].

Существующие способы получения бетулина можно разделить на две основные группы. Одна из них основана на экстракции внешнего слоя коры различными растворителями и выделении из полученных экстрактов бетулина. Вторая группа способов включает щелочной гидролиз бересты и последующую экстракцию спиртом [20]. Максимальный выход бетулина достигается только при исчерпывающем щелочном гидролизе измельченной бересты (1-3 мм), который протекает в достаточно жестких условиях: концентрация щелочи 20-25% и продолжительность гидролиза до 6-8 ч [90, 183].

Используемые методы экстракционного извлечения БАВ из древесного сырья имеют следующие недостатки: многостадийность, продолжительность процесса выделения, необходимость применения легковоспламеняемых и токсичных реагентов и высокая стоимость [31, 77, 90, 132, 278].

С целью повышения эффективности экстракционных процессов применяются различные способы предварительной подготовки сырья:

1. Предварительная кратковременная активация коры перегретым водяным паром («взрывной автогидролиз»), последующий щелочной гидролиз активированной бересты и экстракция бетулина спиртом [134]. Установлено, что степень его извлечения возрастает на 25-40% после активации паром (240 ºС, давление водяного пара 3,4 МПа) в результате разрыхления бересты и ее частичного гидролиза [31, 90, 134, 183].

2. Обработка бересты паром в присутствии щелочи (240º С, давление водяного пара 3,4 МПа, концентрация щелочи 20%, продолжительность 240 с) и экстракция низшими алифатическими спиртами позволило достичь 97% степени извлечения бетулина [90, 183]. Установлен факт значительного (в 1,5-2 раза) возрастания выхода экстрактивных веществ, извлекаемых гексаном, этилацетатом, изопропанолом и водой из коры березы, активированной перегретым водяным паром в условиях «взрывного» автогидролиза [183]. Выявлено, что при оптимальных условиях переработки из одной тонны сухой березовой коры можно получить 80-90 кг бетулина, 70-80 кг субериновых веществ, 130-150 кг полифенолов, 450-500 кг энтеросорбента [89].

3. Предложен метод сверхкритической экстракции (экстрагент - диоксид углерода) [278], который позволяет выделить из 1 кг бересты 200 г тритерпеноидов (20 г лупеола и 170 г бетулина).

Микроскопическое изучение сечений частиц бересты, подвергнутой экстракции, показало, что проникновение растворителя и диффузия экстрактивных веществ из бересты происходят, в основном, между слоями пластинок. Поэтому для ускорения процесса экстракции очень важно не только измельчить бересту до

частиц определенного размера (по площади), но и разорвать их на тонкие пластинки [77]. С этой целью был предложен метод предварительной механохимической активации бересты со щелочью в течение 2 мин с последующей экстракцией водным этанолом - выход бетулина составил 43 % от веса абсолютно сухой бересты [132, 154].

### 1.4.1. Механохимическая активация

Механическая энергия занимает заметное место среди современных видов энергии, ее применение во многих случаях является необходимым этапом подготовки веществ к различному роду технологических операций [15].

Термин «механохимия» введен В. Оствальдом, который рассматривал различные виды стимулирования химических процессов [255]. Одним из основателей механохимии принято считать американского химика М. Керри-Ли, который на примере разложения галогенидов серебра впервые установил специфику и отличие механохимических процессов от термических. В России, одной из первых в рассматриваемой области, была выполнена работа Ф.М. Флавицкого, наблюдавшего протекание твердофазной реакции при механической обработке порошков [15].

Механическое воздействие на твердое вещество представляет собой комбинацию давления и сдвига. Важно, как показано В. Коматсу, учитывать число и площадь контактов, которые определяют скорость твердофазной реакции [15].

Результатом действия давления являются изменения внутри частиц твердых веществ. Эти изменения подразделяются на изменения реальной структуры, прежде всего концентрации различного рода дефектов, изменения межатомных расстояний, углов связей и изменения, происходящие в атомах или ионах [15, 104]. Установлено, что давление может влиять как на структуру самой мембраны, так и на конформацию образующих ее молекул. Изменение межмолекулярного расстояния и взаимной ориентации молекул при повышении давления может приводить не только к межмолекулярным, но и к внутримолекулярным изменениям [45, 104].

Наиболее распространенными и эффективными способами передачи энергии в процессах измельчения являются ударные воздействия, так как именно они позволяют концентрировать механическую энергию в определенных участках обрабатываемого тела в количествах, необходимых для его разрушения. Ударные воздействия реализуются в большинстве конструкций современных измельчительных аппаратов: дезинтеграторах, шаровых, струйных, вибрационных, планетарных, ударно-дисковых и других типах мельниц [104]. Изучение

возможностей трансформации свойств веществ в таких устройствах путем передачи механической энергии частицам порошка, представляет, наряду с несомненным практическим, и научный интерес, так как позволяет прояснить вопросы устойчивости и стабильности кристаллических структур веществ в условиях сильных деформаций. Эффективность измельчения и изменение свойств материалов в результате механической обработки, именуемое в настоящее время механической активацией, определяются природой химической связи (прочностными характеристиками измельчаемого вещества) и динамическими характеристиками измельчительного устройства [24, 104, 192, 203]. К настоящему времени интенсивность ударного воздействия в современных измельчительных устройствах достигла значений, позволяющих эффективно вмешиваться в структуру кристаллов, что дает возможность менять свойства материалов в широком диапазоне [2].

Проведение механической активации в мельницах – наиболее распространенная операция в механохимии. Это обусловлено, во-первых, относительной простотой проведения эксперимента и во - вторых, тем интересом, который проявляют к механохимии технологи, поскольку мельница – один из наиболее распространенных аппаратов для осуществления механического воздействия на вещество [15].

В основе лежит два основных принципа: во-первых, импульсный характер процесса (чередование процессов возникновения поля напряжения и его релаксации); во – вторых, локальный характер механического воздействия на вещество (при механической обработке поле напряжений возникает не во всем объеме твердой частицы, а только на ее контакте с другой частицей или рабочим телом).

Измельчение проводят с целью получения максимальной поверхности порошка при минимальных затратах энергии, а активацию - с целью накопления энергии в виде дефектов или других изменений в твердом веществе, которые позволяют снизить энергию активации его последующего химического превращения или улучшить стерические условия для протекания процесса.

Различают два случая механической активации: в первом - время механического воздействия и формирования поля напряжения и его релаксации больше времени химической реакции (такие процессы принято называть механохимическими); во - втором, наоборот, время механического воздействия и формирования поля напряжений меньше времени химической реакции, или вообще эти процессы разделены во времени (называется механической активацией) [15].

Установлен факт, что изменение реакционной способности твердых веществ при механической активации происходит не столько за счет увеличения поверхности при измельчении, сколько за счет накопления в твердом теле различного рода дефектов [14, 15, 104].

В особых условиях механической обработки материалов с различающимися механическими свойствами могут получаться порошки композитов, состоящих из центральной частицы, окруженной верхним слоем. Формируются микрокомпозиты, состоящие из субмикронных частиц и имеющие очень развитый контакт между фазами. Таким образом, растворяется уже не само вещество, а его комплексы, появляется возможность увеличения растворимости веществ [104, 132]. Например, механическая деструкции листьев крапивы на планетарной мельнице АГО (до размеров частиц в интервале значений от сотен нанометров до десятков микрон) приводит к увеличению выхода водорастворимых веществ более чем в два раза. Результаты объясняются тем, что механическая обработка сырья приводит к разрушению ассоциированных молекул различных классов соединений и их переходу в водорастворимое состояние [14, 52, 103, 151, 207].

Установлено, что механохимическая активация со щелочью в оптимальных условиях увеличивает выход гиперицина из растительного сырья в 10 раз по сравнению с экстракцией необработанной травы зверобоя [103].

Таким образом, данный метод можно рекомендовать для рационализации процесса извлечения ценных БАВ бересты без использования токсичных растворителей и с большей эффективностью [14, 104, 132].

## 1.5. Биологическая активность *Betula pendula* Roth. и *Betula pubescens* Ehrh. и применение их в медицине

В лекарственных целях используются почки *(Betulae gemmae)*, молодые листья *(Betulae folia)*, березовый сок *(Betulae succus)*, кора (береста) *(Betulae cortex)*, чага (*Fungus betulinus* или *Inonotus obliquus)*, а также березовый деготь *(Betulae pix)* и активированный уголь (*Carbo activatus)* [92, 195, 202].

В официнальной медицине применяют почки и листья березы повислой и березы пушистой [38, 39, 86], чагу [38, 39, 41], активированный уголь [38, 39] и березовый деготь [38, 39].

**Листья и почки березы** применяют как диуретические средства при отечном синдроме (хроническая сердечная недостаточность, заболевания почек) [38, 39, 74, 100, 165, 194, 195].

**Листья березы** входят в состав диуретического препарата «Бекворин» и «Фитолизин», последний применяют при камнях в почках и мочевом пузыре как мочегонное, противовоспалительное и спазмолитическое средство [38, 39, 92, 169]. Из листьев березы производят экстракт сухой, обладающий желчегонной, противовоспалительной активностью. Экстракт входит в состав гепатопротекторного препарата «Сибектан» [38, 39].

**Гриб березовый (чага)** оказывает противовоспалительное действие, улучшает состояние больных, устраняет расстройства глотания, уменьшает осиплость, снижает потоотделение, повышает защитные реакции организма, активирует обмен веществ в мозговой ткани и повышает биоэлектрическую активность коры головного мозга, устраняет болевой синдром и диспепсические явления, нормализует функцию кишечника, оказывает общетонизирующее действие, регулирует метаболические процессы, способствует повышению общей резистентности организма. Отвар из внутренней части гриба оказывает некоторое гипогликемическое действие. Применяют чагу при пародонтозе, хроническом гастрите, язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, дискинезии желчевыводящих путей и кишечника, колите, а также в симптоматической терапии злокачественных новообразования различной локализации для улучшения общего самочувствия [38, 39, 86, 165, 194, 195]. Из чаги производят лекарственное средство «Бефунгин» (экстракт из чаги и кобальта хлорид), который применяется для нормализации функций органов ЖКТ, кроме этого он оказывает общетонизирующее и анальгезирующее действие [169, 194].

**Активированный уголь** проявляет энтеросорбирующее, дезинтоксикационное и противодиарейное действие. Относится к группе поливалентных физико-химических антидотов, обладает большой поверхностной активностью, адсорбирует яды и токсины из желудочно-кишечного тракта до их всасывания. Применяется при диспепсии, метеоризме, процессах гниения, брожения; гиперсекреции слизи, соляной кислоты, желудочного сока; диареи; отравлении алкалоидами, гликозидами, солями тяжелых металлов; пищевой интоксикации; дизентерии, сальмонеллезе; ожоговой болезни в стадии токсемии и септикотоксемии; почечной недостаточности, хроническом гепатите, остром вирусном гепатите, циррозе печени; атопическом дерматите, бронхиальной астме, гастрите, хроническом холецистите, энтероколите, холецистопанкреатите; отравлениях химическими соединениями и ЛС (в т.ч. фосфорорганическими и хлорорганическими соединениями, психоактивными ЛС), аллергических заболеваниях, нарушении обмена веществ, абстинентном алкогольном синдроме; интоксикации у онкологических больных на фоне лучевой и химиотерапии;

подготовке к рентгенологическим и эндоскопическим исследованиям (для уменьшения содержания газов в кишечнике) [38, 39, 165, 194, 195].

**Деготь березовый** оказывает противопедикулезное, местнораздражающее, антисептическое при псориазе, экземе, нейродермите [86, 169, 194, 195, 202]. Раньше широко использовался как противомикробное средство в хирургической практике. Он входил в состав многих мазей и линиментов (мазь Вишневского, мазь Вилькинсона и др.), дегтярной воды, серно-дегтярного мыла. Сейчас в связи с наличием более эффективных антисептических средств мазь Вишневского в хирургии применяют редко [92, 194, 195, 202].

Целебные свойства березы известны давно. Многочисленные советы по лечению заболеваний внутренних органов и кожи настоями и отварами почек и листьев березы, а также березовым соком приводятся в травниках XVI-XVII вв [92].

На Руси настойку почек березы применяли для лечения холеры, при рвоте. Париться с березовым веником считалось полезным при болях в суставах, подагре и радикулитах, а также при простудных и кожных заболеваниях [92].

Хорошим ранозаживляющим средством был и березовый уголь, что указано в «Малорусском лечебнике» XVIII в. При чесотке применяли мазь, в состав которой входил березовый деготь, сера и старое сало [92].

Есть сведения, что настой из листьев березы во время Великой Отечественной войны употребляли как общеукрепляющее средство [92, 165, 194].

В 1834 г. в «Русской медицинской газете» появилось сообщение о применении листьев березы при водянке. В 1894 г. клинически было установлено ее диуретическое действие. В 20-х годах XX в. описан клинический случай, когда у пациента с сердечными отеками, которого лечили наперстянкой, после приема настоя листьев березы диурез увеличился с 500 мл до 2,5 л [92]. Эти данные были подтверждены исследованиями, проведенными в Хабаровском медицинском институте, свидетельствующими о значительной ценности березы как источника мягкодействующих мочегонных средств [202].

В народной медицине препараты из листьев и почек березы используют при бронхитах, туберкулезе, гиперацидном гастрите и язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, мочекаменной болезни, отеках и подагре [86, 92, 165], комплексном лечении заболеваний печени [92, 194, 195].

Галеновые препараты почек и листьев березы рекомендуют при гипо- и авитаминозе [92, 194], атеросклерозе [92].

Настои и отвары почек березы применяют в виде полосканий и аппликаций в отоларингологии и стоматологии как противовоспалительное, противоотечное

и эпителизирующее средство при стоматитах, гингивитах, пародонтозе, глосситах, ангинах, хроническом тонзиллите, отитах, острых респираторных заболеваниях [92].

Настой листьев березы используют при ожогах, абсцессах, инфицированных ранах [92, 165], как потогонное средство при лихорадке [92, 194, 195].

Мытье головы отваром листьев рекомендуют для укрепления и улучшения роста волос [92, 165, 202].

Почки березы используют как антисептическое и отхаркивающее средство при заболеваниях органов дыхания (ларингитах, бронхитах, трахеитах) [92, 194, 195], как противовоспалительное, антисептическое и ранозаживляющее средство в виде лечебных и гигиенических ванн, примочек и повязок при мелких ранениях и травмах мягких тканей, гематомах, трофических язвах, пролежнях, плохо заживающих хронических гнойных ранах [86, 92, 194, 195], для лечения острых и хронических экзем, дерматитов с явлениями раздражения и зуда [92]. При этом современный анализ средств, которые использовались в русской медицине за последние 200 лет при лечении гнойных ран, показал, что наиболее часто применялись почки березы [92, 165, 195].

Отвар или настойки из почек, кроме того, считаются эффективным средством при хронической диарее и глистной инвазии (аскаридами и острицами) [92, 165].

Почками березы рекомендовали натирать десна при цинге [92].

Отвар почек входит в состав помад и кремов [92].

Препараты березы эффективны и в акушерско-гинекологической практике: настой листьев употребляют при гипоменструальном синдроме, отеках у беременных, нефропатии, климактерических неврозах; отвар почек — при нефропатии; настойку листьев, почек и березовый сок как общеукрепляющее средство при анемии в послеродовом периоде и при климактерических неврозах. Ванночки и тампоны с 20% настоя почек или листьев применяют при эрозиях шейки матки и эндометритах [92].

В украинской народной медицине популярно ранозаживляющее средство «березовка» — настойка березовых почек, которую также применяли при ревматизме и артритах. Как мочегонное, потогонное и желчегонное средство препараты молодых листьев березы популярны и в народной медицине стран Западной Европы — Франции, Германии, Австрии, Польши, Болгарии [92, 165]. В народной медицине Франции березу называют «деревом мудрости» [92].

Березовый сок проявляет мочегонное, отхаркивающее и глистогонное действие. Его используют как диетический напиток, в комплексном лечении

мочекаменной болезни, как общеукрепляющее и кровоочистительное средство при заболеваниях дыхательных путей (бронхитах, бронхоэктазах, туберкулезе), кожи (экземах, лишаях, фурункулах), суставов, при нарушении обмена веществ, цинге, подагре, диатезе, кровопотерях, при лихорадке и для профилактики кариеса [86, 92, 165, 194, 195].

Березовый деготь используют при ревматизме, заболеваниях печени и женских болезнях [92, 165]. Из березового дегтя получают эфирное масло, проявляющее противоглистное (от аскаридоза) и мочегонную активность [92, 165].

Настойку мужских (тычиночных соцветий) применяют при заболеваниях сердца, язвенной болезни желудка, гастритах, экземах, фурункулезе и анемии [92, 165].

Отвар березовой коры (бересты) используют как жаропонижающее и мочегонное средство при простудных заболеваниях, желтухе; наружно (верхнюю пленку бересты прикладывают к метам поражения) – как ранозаживляющее и дезинфицирующее средство при абсцессах, фурункулах, чесотке, грибковых заболеваниях кожи, гипергидрозе [30, 77, 92, 165]. Распаренную бересту применяли при переломах костей как гипс [92, 195].

В тибетской медицине кору березы используют при ожогах и гнойных ранах [92].

Экспериментально установлено, что сухие экстракты из бересты проявляют выраженные противовоспалительные [63, 164], антигипоксические [70, 139, 169], антиоксидантные [50, 54, 70, 87, 144, 169], гепатопротекторные [186], гастропротективные [88], иммуностимулирующие [61, 169, 223,], специфические антимикобактериальные (изучено на модели экспериментального туберкулеза у мышей) [53, 141, 169, 223], антимикробные [145], противовирусные [146] в отношении вируса гриппа [57, 162, 169], герпеса [161, 169], гепатита С [63, 78, 138, 140, 142, 169], сахароснижающие [144], гиполипидемические [65, 144], противоаллергенные [56, 72], интерфероиндуцирующие [63, 140, 142], антимутагенные [55, 49, 169], адаптогенные [169], регенерирующие [135, 169, 223] свойства и не обладает нежелательными иммунотоксической и аллергезирующей активностями [54, 72].

В настоящее время сухой экстракт бересты в ходит в состав биологически активных добавок: «Бетулавитин» (биоантиоксидантный комплекс из биомассы женьшеня, бересты экстракт сухой и витамин Е в виде токоферола ацетата), «Бетула-Хит» (бересты экстракт сухой, березы листья, чага (березовый гриб), «Бетуланорм» (бересты экстракт сухой, боярышника плоды, мелиссы лекарственной трава), «Бетулайн» (бересты экстракт сухой, фукуса пищевого

порошок), «Бетулаир» (бересты экстракт сухой, аира корневища, подорожника большого листья), «Бетулагепат» (бересты экстракт сухой, шиповника экстракт сухой), «Бетула-Шарм» (бересты экстракт сухой, шиповника плоды, черной смородины плоды), «Тубелон» (бересты экстракт сухой, цетрарии исландской слоевища (исландский мох), душицы трава).

Получены из экстракта бересты нанодисперсии для солюбилизации плохо растворимых в воде веществ [66] и установлена возможность их применения в качестве адъюванта вакцинных препаратов [33, 85, 148].

Разработан способ получения энтеросорбентов из отходов окорки березы, содержащих около 84% луба и 16% бересты. Обработка данного сырья раствором щелочи позволяет получить продукт со свойствами, близкими к промышленному энтеросорбенту «полифенап» [157,173].

После химической обработки бересты остается около 50% отхода – целлолигнина (лигниноуглеводный комплекс), являющийся источником получения компостов для повышения плодородия почв и урожайности сельскохозяйственных культур [91].

Таким образом, береза является источником ценного сырья - почек, листьев, бересты, сока, также используется стволовая древесина, которая находит применение в целлюлозно-бумажной и деревообрабатывающей промышленности, при изготовлении древесного угля [17,77].

На лесосеках после рубки и на деревообрабатывающих предприятиях, в результате окорки, скапливается большое количество отходов, которые не имеют промышленного применения [23,71, 132, 166]. Наиболее многотоннажным из отходов березы является кора (составляет 10-15% от массы березы) [17, 23, 77], которая либо сжигается [23], либо увозится в отвалы - при длительном хранении является источником целого ряда фенольных соединений, которые смываются метеорологическими осадками и талыми водами, загрязняя окружающую среду [23, 71, 98]. Вопрос использования такого огромного количества березовой коры превращается в актуальную и серьезную проблему.

Березовая кора состоит из внешнего слоя (бересты) и внутреннего слоя (луба), которые значительно отличаются друг от друга по механическим характеристикам и химическому составу [23, 46, 99, 183].

На долю наружного слоя коры-бересты приходится 16 - 20% от ее массы [77]. При проведении литературного обзора установлено, что береста содержит ряд ценных химических веществ, обладающих широким спектром биологической активности, что стимулируют исследования по разработке эффективных и экономически приемлемых методов их извлечения.

В настоящее время известно, что получаемые при механохимической переработке растительного сырья биологически активные препараты подвергаются меньшему химическому воздействию по сравнению с жидкофазными экстракционными технологиями, сохраняют близкий к исходному натуральный состав и оказываются более приемлемыми для организма животных и человека [132]. Однако исследований влияния механохимической активации на выход БАВ из бересты не проводились.

В связи с вышеизложенным, мы посвятили экспериментальную часть диссертации сравнительному фармакогностическому анализу бересты *B. pendula* и *B. pubescens*, собранной из разных точек ареала и исследованию влияния механохимической активации на качественный состав, количественное содержание БАВ бересты и ее биологическую активность.

## Список сокращений

ГБОУ ВПО НГМУ МЗ РФ – Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

НСО – Новосибирская область

ГФ – Государственная фармакопея

ОФС – общая фармакопейная статья

ОСТ – отраслевой стандарт

РСО – рабочий стандартный образец

СОВС - стандартный образец вещества-свидетеля

СФ – спектрофотометр

УФ – ультрафиолетовый

БАВ – биологически активные вещества

ЛРС – лекарственное растительное сырье

КИ – классически измельченная

МХИ – механохимически активированная

Рис. – рисунок

Табл. – таблица

БХ – бумажная хроматография

ТСХ – тонкослойная хроматография

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ММП – матриксные металлопротеиназы

АлТ – аланинаминотрансфераза

КИБ – береста классически измельченная

МХИБ – береста механохимически активированная

МХИБЭ20 – сухой экстракт, полученный из механохимически активированной бересты на 20% спирте этиловом

МХИБЭ80 - сухой экстракт, полученный из механохимически активированной бересты на 80% спирте этиловом

КИБЭ20 - сухой экстракт, полученный из классически измельченной бересты на 20% спирте этиловом

КИБЭ80 - сухой экстракт, полученный из классически измельченной бересты на 80% спирте этиловом

Ув. - увеличение

# ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## 2.1. Объекты исследования

Объектами для исследования служили образцы внешней части коры (бересты) березы повислой (***Betula pendula*** **Roth.**) и березы пушистой (***Betula pubescens*** **Ehrh.**) сем. Березовые (**Betulaceae**), собранные в 2012-2013 гг. из разных точек ареала, измельченные двумя методами - общепринятым и механохимической активацией. Для микроскопических исследований были собраны гербаризированные образцы (1-14) *B. pendula* и *B. pubescens* (молодые побеги с развитыми листьями) (табл.2.1).

Таблица 2.1

**Образцы, взятые для исследования**

| № образца | Вид березы | Место сбора | Дата сбора |
|---|---|---|---|
| 1 | *B. pendula* | Тогучинский район, Новосибирская область (НСО), «Буготагские сопки», березовый колок | 13.06.12 |
| 2 | *B. pendula* | Колыванский район, (НСО), 60 км от г. Новосибирска, березовый лес | 27.05.12 |
| 3 | *B. pendula* | 30 км от п. Лесогорска, Чунский район, Иркутская область, березовый лес | 22.07.12 |
| 4 | *B. pendula* | 15 км от п. Венгерово, Венгеровский район (НСО), березовый колок | 28.06.12 |
| 5 | *B. pubescens* | Колыванский район, НСО, Кудряшовский бор, 30 км от г. Новосибирска | 08.06.12 |
| 6 | *B. pubescens* | Прибрежная зона озера Сикачи, Волчихинский район, Алтайский край, хвойно-широколиственный лес | 24.06.12 |
| 7 | *B. pubescens* | Костромская область, Кологривский район, хвойно-широколиственный лес | 30.08.12 |
| 8 | *B. pubescens* | Пермский край, Верещагинский район, опушка леса | 27.07.12 |
| 9 | *B. pendula* | Тогучинский район, НСО, «Буготагские сопки», подножие сопки, березовый колок. Образец бересты, взятый со ствола растущего дерева, на высоте 1,2 м от основания | 05.09.13 |
| 10 | | Тогучинский район, НСО, «Буготагские сопки», подножие сопки, березовый колок. Образец бересты, взятый со ствола растущего дерева на высоте 2 м от основания | |
| 11 | | Тогучинский район, НСО, «Буготагские сопки», подножие сопки, березовый колок. Образец бересты, взятый со ствола | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | растущего дерева на высоте 3,2 м от основания | |
| 12 | | Тогучинский район, НСО, «Буготагские сопки», подножие сопки, березовый колок. Образец бересты, взятый со ствола растущего дерева на высоте 5,7 м от основания | |
| 13 | | Тогучинский район, НСО, «Буготагские сопки», подножие сопки, березовый колок. Образец бересты, взятый со ствола растущего дерева на высоте 12 м от основания | |
| 14 | | Тогучинский район, НСО, «Буготагские сопки», подножие сопки, березовый колок. Образец бересты, взятый со ствола растущего дерева на высоте 14 м от основания | |
| 15 | | Береста, собранная со срубленных деревьев (на дрова) в Новосибирской области в окрестностях поселка Гусиный брод и измельченная классическим способом (образец КИБ) | 16.06.12 |
| 16 | | Береста, собранная со срубленных деревьев (на дрова) в Новосибирской области в окрестностях поселка Гусиный брод и измельченная механохимической активацией (образец МХИБ) | |

Все образцы бересты сушились воздушно-теневой сушкой.

## Характеристика образцов

Образец бересты КИ – кусочки бересты различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм. Цвет светло-бежевый, бежево-коричневый. Запах слабый, вкус своеобразный, слегка вяжущий (рис. 2.1).

Образец бересты МХИ - плотный темно-коричневый порошок с преобладанием фракций с размером частиц - 0,315 мм, со слабым запахом и вяжущим вкусом (рис. 2.2). Механохимическая активация бересты проведена с использованием активатора центробежного типа – мельнице АГО-2 (в лаборатории Института химии твердого тела и механохимии СО РАН) – в качестве мелющих тел использовались стальные шары диаметром 6 мм, загрузка шаров – 200 г на 10 г обрабатываемого вещества, расчетное ускорение мелющих тел – 200-600 м/с, расчетная интенсивность обработки – 1 Вт/г, время обработки – 30 минут.

**Рисунок 2.1.** Образец бересты, измельченный классическим методом

**Рисунок 2.2.** Образец бересты, измельченный методом механохимической активации

## 2.2. Фармакогностические методы

### 2.2.1. Макроскопический анализ

Макроскопические признаки сырья бересты устанавливали и описывали согласно требованиям ГФ XI [41] - статья «Коры».

### 2.2.2. Микроскопический анализ

Анатомо-морфологический анализ морфологических групп сырья (листья, береста) проводили на высушенном материале в соответствии с требованиями общих фармакопейных статей ГФ XI «Методы анализа лекарственного растительного сырья», «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» [41]. Высушенный материал (листья, береста) размачивался горячим (кипячением в 5% растворе натрия гидроксида) способом, листья предварительно кипятили в 96% спирте этиловом, а затем в 70% для удаления пигментов. Для окраски препаратов использовали реактивы: Судан III, IV (эфирные, жирные масла и липофильные соединения окрашиваются в розовый и желтый цвета соответственно), 1% раствор n-нитроанилина (лигнифицированные клеточные стенки окрашиваются в оранжевый и желтый цвета), реактив Люголя (крахмальные зерна окрашиваются в синий и черно-синий цвета).

При исследовании морфологических признаков сырья использовали стереоскопические бинокулярные микроскопы МБС-9 при увеличении 3,33×100. Морфометрические показатели определяли с помощью стандартных измерительных средств (линейка, миллиметровая бумага, штангенциркуль).

Микроскопические исследования образцов сырья проводили на микроскопе «Микмед» при увеличении в 7×10, 10×10,15×10, 7×40, 10×40, 15×40 раз.

Фрагменты анатомической структуры фиксировали с использованием рисовального аппарата РА-7У, а также на микроскопе проходящего и отраженного света Axioskop 2 plus (Zeiss), тип лампы HBO 50 HAL 100, объективы Plan NEOFLUAR 10x/0.3 Ph1 Plan NEOFLUAR 20x/0.5 Ph 2 Plan NEOFLUAR 40x/0.75 Ph 2 Plan NEOFLUAR 100x/1.3 Oil, фильтры/лазеры Set 02 (G 365, FT 395, LP 420) (Zeiss) Set 10 (BP 450-490, FT 510, BP 515-565) (Zeiss) – Excitation – 489 nm, Emission – 509 nm**,** Set 15 (BP 546/12, FT 580, LP 590) (Zeiss), цифровая камера AxioCam HRc (Zeiss), программное обеспечение AxioVision (Zeiss). Отдельные фрагменты исследований выполнены на люминесцентном микроскопе SteREO Lumar.V12 (Zeiss), объективы HBO 50 KL 1500 LSD; тип лампы NeoLumar S 0.8x FWD 80mm; фильтры и лазеры Set 49(G 365, FT 395, BP 445/50) (Zeiss) Set 38 (BP 470/40, FT 495, BP 525/50) (Zeiss) Set 13 (BP 470/20, FT 495, BP 505/530) (Zeiss); цифровая камера Cool SNAP fx (Photometrics); программное обеспечение WinView (Roper Scientific) и на конфокальном сканирующем лазерном микроскопе LSM 510 META при увеличении до 600 раз в проходящем свете в Институте Цитологии и Генетики СО РАН.

### 2.2.3. Общий фитохимический анализ на основные группы биологически активных соединений бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*

Для обнаружения БАВ в бересте *B. pendula* и *B. pubescens* был получен ряд извлечений: около 3,0 г образца бересты, измельченной до частиц размером 3 мм, помещали в колбу, заливали 50 мл 70% этанола, колбу соединяли с прямым воздушным холодильником и выдерживали на водяной бане в течение 30 минут с момента закипания экстрагента. Полученное извлечение отфильтровывали, сырье повторно экстрагировали в тех же условиях (объем экстрагента 30 мл). Из объединенного фильтрата удаляли этанол. Водный остаток помещали в делительную воронку и подвергали жидкость-жидкостной экстракции: последовательно экстрагировали хлороформом, этилацетатом и бутанолом. Экстракцию каждый раз проводили трижды, используя по 30 мл экстрагента. В результате получили ряд извлечений и водный остаток.

Качественный анализ извлечений на наличие основных групп БАВ проводили с использованием характерных реакций [43, 67, 69, 82, 118, 159, 213, 226], условия которых приведены в таблице 2.2.

Таблица 2.2

**Условия проведения качественных реакций**

| Группа веществ | Реактивы методика проведения | Аналитический сигнал |
|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| **Тритерпеновые соединения** | Пенообразование (при энергичном взбалтывании водного, водно-спиртового извлечения) | Образование пены |
| | Реакция *Лафона* (к 2 мл извлечения прилить 1 мл конц. кислоты серной, 1 мл этилового спирта, 1 каплю 10% раствора железа сульфата (II), (нагревание) | Сине-зеленое окрашивание |
| | Реакция на сырье: прилить 1-2 мл 25%-ного раствора кислоты фосфорновольфрамовой (нагревание) | Оранжевое окрашивание |
| | Реакция на сырье: прилить 1 мл 10%-ного раствора кислоты фосфорномолибденовой (нагревание) | Синее окрашивание |
| **Флавоноиды** | Проба *Chinoda* (к извлечению добавить металлический магний или цинк и осторожно по каплям прилить конц. HCl) | Красно-оранжевое окрашивание |
| | К извлечению прилить 5% спиртовый раствор алюминия хлорида (III) | Желтое окрашивание |
| **Дубильные вещества** | 10% водный раствор $FeNH_4(SO_4)_2$ | Черно-зеленое окрашивание (конденсированные дубильные вещества), черно-синее окрашивание (гидролизуемые дубильные вещества) |
| | Реакция с бромной водой (к 3 мл извлечения приливать по каплям бромную воду до тех пор, пока в жидкости станет ощущаться запах брома) | Осадок (конденсированные дубильные вещества) |
| | К извлечению прилить 2 мл 10% раствора $CH_3COOH$, 1 мл 10% водного раствора $Pb(CH_3COO)_2$*, далее добавить 5 капель 1% раствора $FeNH_4(SO_4)_2$ и 10 мл 10% раствора $Pb(CH_3COO)_2$** | *Осадок (гидролизуемые дубильные вещества) **Черно-зеленое окрашивание (конденсированные дубильные вещества) |
| | Лактонная проба (к 5 мл извлечения добавить 10 капель 10% раствора натрия гидроксида в | |

| | | |
|---|---|---|
| **Кумарины** | 95% спирте этиловом, прилить 5 мл воды очищенной и 10% раствора кислоты хлористоводородной до кислой реакции) | Помутнение |
| | Реакция *Паули* (к 1 мл извлечения прилить 1 мл 5% раствора гидроксида натрия в 95% спирте этиловом, подогреть на кипящей водяной бане в течение 3-5 мин, прилить 1 мл свежеприготовленного раствора диазотированной сульфаниловой кислоты) | Вишнево-красное окрашивание |
| **Аминокислоты** | Реакция *Руэмана* (к 2 мл извлечения прилить 2 мл 0,2% раствор нингидрина в 70% спирте этиловом, нагреть на кипящей водяной бане в течение 10-15 мин) | Фиолетовое окрашивание |
| **Полисахариды** | К 1 мл водного извлечения прилить 3 мл 95% спирта этилового | Появление мути, выпадение осадка |
| **Алкалоиды** | Общеосадительные реактивы: *Вагнера, Бушарда, Майера, Марме, Драгендорфа* | Осадки |
| **Гидроксикоричные кислоты** | Реакция *Паули* (к 1 мл извлечения прилить 1 мл 5% раствора гидроксида натрия в 95% спирте этиловом, прилить 1 мл свежеприготовленного раствора диазотированной сульфаниловой кислоты) | Окрашивание от розового (желтого) до вишнево-красного |

## 2.3. Аналитические методы разделения биологически активных соединений

### 2.3.1. Хроматография на бумаге (БХ)

Условия хроматографического разделения основных групп БАВ [4, 43, 44, 69, 82, 113, 156, 210, 213, 226] бересты *B. pendula* и *B. pubescens* представлены в таблице 2.3.

Таблица 2.3

**Условия БХ**

| Класс соединений | Вид хроматографии | Сорт бумаги | Подвижная фаза |
|---|---|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Флавоноиды** | Восходящая | Ленинградская «Медленная» | 15% раствор $CH_3COOH$ |
| | Восходящая | Ленинградская «Средняя» | 15% раствор $CH_3COOH$ |
| | Восходящая | «Filtrak» FN6 (Германия) | н-Бутанол- кислота уксусная - вода (4:1:2) |
| | Восходящая | «Filtrak» FN6 (Германия) | Система Форесталя (кислота уксусная – кислота хлористоводородная – вода (30:3:10) |
| | Двумерная восходящая | «Filtrak» FN6 (Германия) | 1 направление - н-Бутанол-кислота уксусная -вода (4:1:2) |
| | | | 2 направление - 15% раствор $CH_3COOH$ |
| **Фенолкарбоновые и гидроксикоричные кислоты** | Восходящая | Ленинградская «Медленная» | 1% раствор кислоты хлористоводородной |
| | Восходящая | Ленинградская «Средняя» | 1% раствор кислоты хлористоводородной |
| | Восходящая | «Filtrak» FN3 (Германия) | 2% раствор $CH_3COOH$ |
| | Восходящая | «Filtrak» FN6 (Германия) | Система Форесталя (кислота уксусная – кислота хлористоводородная – вода (30:3:10) |
| | Двумерная восходящая | «Filtrak» FN3 (Германия) | 1 направление - 2% раствор $CH_3COOH$ |
| | | | 2 направление - н-Бутанол-кислота уксусная -вода (4:1:2) |
| **Аминокислоты** | Восходящая (дважды) | «Filtrak» FN6 (Германия) | н-Бутанол-диэтиловый эфир-кислота уксусная - вода (9:6:3:1) |

### 2.3.2. Хроматография в тонком слое (ТСХ)

Условия хроматографического разделения [34, 37, 43, 75, 156, 171, 209, 210] представлены в таблице 2.4.

Таблица 2.4

**Условия ТСХ**

| Класс соединений | Вид хроматографии | Сорт пластин | Подвижная фаза |
|---|---|---|---|
| **Кумарины** | Восходящая | Sorbfil | толуол-эфир диэтиловый(4:6), насыщенные 10% кислотой уксусной |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | Восходящая | Sorbfil | бензол-ацетон (6:4), насыщенные 10% кислотой уксусной |
| **Тритерпеновые сапонины** | Восходящая | Sorbfil | хлороформ-этанол (1:1) |
| | Восходящая | Sorbfil | бензол-этилацетат (3:1) |
| | Восходящая | Sorbfil | бутанол-этанол-аммиак (7:2:5) |

### 2.3.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) Определение состава фенольных соединений

Анализ проводили на хроматографе фирмы «Waters Breeze2» (насосный блок Waters 1525 Binary HPLC Pump) с УФ - детектором (UV/Visible Detector 2489), последующей обработкой результатов исследования с помощью программы Waters Breeze2 Software в ЗАО «Сибирский центр фармакологии и биотехнологии», г. Новосибирск.

Использовалась обращенно-фазовая металлическая термостатируемая колонка Luna C18 RS (250x4,6) мм, заполненная адсорбентом Phenomenex с диаметром частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовались два элюента (элюент «А» и элюент «В»). Элюент «А» - кислота ортофосфорная 0,1%; элюент «В» - ацетонитрил 100%. Анализ проводили в градиентном режиме от 0 до 100% элюента «В». Аналитическая длина волны 260 и 320 нм; скорость потока - 1мл/мин; время хроматографии - 44 минуты; объем инжекции – 20 мкл. Вещества идентифицировали, сравнивая $t_R$ (время удерживания) с $t_R$ стандартных образцов (РСО, ГСО).

## 2.4. Препаративные методы разделения биологически активных соединений

### 2.4.1. Препаративная хроматография на пластинках Sorbfil

Методом ТСХ нами было установлено присутствие кумарина в образцах бересты. Для установления его преобладания в сумме кумаринов провели препаративное выделение кумарина с помощью ТСХ.

Для этого сумму кумаринов, очищенную от сопутствующих веществ, наносили капилляром на линию старта пластинки Sorbfil. Пластинку помещали в хроматографическую камеру, насыщенную системой растворителей: толуол-эфир диэтиловый (4:6), насыщенной 10% кислотой уксусной.

После прохождения фронта растворителя не менее 12 см, хроматограмму вынимали, высушивали на воздухе и просматривали в УФ - свете. Отмечали границы вещества (кумарина) с Rf=0,95. С отмеченных зон снимали слои сорбента

и элюировали 96% спиртом этиловым при нагревании. Элюат охлаждали до комнатной температуры и снимали его УФ - спектр в кюветах с толщиной слоя 10 мм на СФ-56. В качестве раствора сравнения использовали элюат с чистой полосы хроматограммы, полученный с использованием 96% спирта этилового.

### 2.4.2. Препаративная хроматография на бумаге

Препаративную хроматографию на бумаге использовали для выделения фенолкарбоновых и гидроксикоричных кислот (см. гл. 3).

## 2.5. Физические методы

### 2.5.1. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

#### *2.5.1.а. Выделение бетулина*

Для выделения бетулина из бересты около 4,0 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц 3 мм, помещали в аппарат Сокслета и проводили исчерпывающую экстракцию гексаном в течение 30 ч. Из полученного гексанового извлечения удаляли экстрагент.

Для разделения нейтральных и кислых веществ гексанового экстракта в круглодонную колбу объемом 250 мл вносили 0,5 г сухого гексанового экстракта и кипятили в 20 мл 20% водного раствора натрия гидроксида в течение трех часов. Реакционную смесь отфильтровывали, вещество на фильтре промывали водой до бесцветных и нейтральных промывных вод, высушивали и делили на две части, первая (фракция №1) оставляли без изменений, а вторую (фракция №2) перекристаллизовали из изопропилового спирта (фракция №2) [60].

ЯМР-спектроскопию полученных образцов (№№1 и 2) проводили на ЯМР-спектрометре Bruker DRX-500 для растворов в дейтерохлороформе (CDCl3), содержащем тетраметилсилан. Стабилизация магнитного поля выполнялась с использованием резонансного сигнала дейтерия растворителя (CDCl3). Для получения ЯМР спектров навеску образца №1 - 10 мг и №2 - 15 мг растворяли в 0,6 мл растворителя. Растворы фильтровали и помещали в специальные стеклянные ампулы для ЯМР диаметром 5 мм. Для каждого образца регистрировали спектры на ядрах водорода ($^{1}H$) на частоте 500, 1300233 МГц и углерода ($^{13}C$) на частоте 125,7578018 МГц. Спектры регистрировали при температуре 300 К. Для регистрации спектров использовали стандартные импульсные программы Bruker. Основные параметры регистрации спектров указаны таблице 2.5.

Таблица 2.5

**Основные параметры регистрации ЯМР – спектров**

| Параметры | Образец №1 | | Образец №2 | |
|---|---|---|---|---|
| Ядра | $^{1}H$ | $^{13}C$ | $^{1}H$ | $^{13}C$ |
| Навеска вещества, мг | 15 | 15 | 10 | 10 |
| Объем растворителя, мл | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 |
| Рабочая частота спектрометра, МГц | 500, 1300233 | 125,7578018 | 500, 1300233 | 125,7578018 |
| Ширина спектрального окна, Гц | 6510,417 | 31446,541 | 5341,880 | 31446,541 |
| Длительность возбуждающего импульса, usec | 10,00 | 7,50 | 10,00 | 7,50 |
| Мощность возбуждающего импульса, дБ | -6,00 | -1,00 | -6,00 | -1,00 |
| Продолжительность выборки спада свободной индукции, сек | 1,2583412 | 0,5210612 | 1,5335923 | 0,5210612 |
| Размер временного домена | 16384 | 32768 | 16384 | 32768 |
| Продолжительность релаксационной задержки, сек | 2,00000000 | 3,00000000 | 2,00000000 | 3,00000000 |
| Число выполненных экспериментов-накоплений | 256 | 392 | 64 | 192 |

### 2.5.2. ИК-спектроскопия

Регистрацию ИК-спектра, выделенного из бересты кумарина, проводили на спектрометре IRPrestige-21/FTIR-8400S (SHIMADZU) в области спектра 3500 – 400 см$^{-1}$ с образцами в таблетках калия бромида. Обработка спектральной информации осуществлялась с помощью программы IR SOLUTION. Идентификацию вещества проводили в сравнении с ИК-спектром стандартного образца кумарина (ГСО).

## 2.6. Химические методы

### 2.6.1. Детекторы хроматограмм

В работе использовались следующие детекторы хроматограмм [4, 13, 34, 37, 43, 44, 82, 118, 156, 171, 209, 213, 226] (табл. 2.6):

Таблица 2.6

**Хромогенные детекторы для обработки хроматограмм**

| Класс соединений | Детекторы |
|---|---|
| **Сапонины** | 25%-ный раствор кислоты фосфорновольфрамовой в 95% спирте этиловом |
| | 10%-ный раствор кислоты фосфорномолибденовой в 95% спирте этиловом |
| **Флавоноиды, кумарины, гидроксикоричные и фенолкарбоновые кислоты** | УФ-свет |
| **Флавоноиды, кумарины, гидроксикоричные и фенолкарбоновые кислоты** | 25% раствор аммиака (пары) |
| **Кумарины, гидроксикоричные и фенолкарбоновые кислоты** | 5% раствор натрия гидроксида в 95% спирте этиловом |
| **Кумарины, гидроксикоричные и фенолкарбоновые кислоты** | Свежеприготовленный раствор диазотированной сульфаниловой кислоты |
| **Флавоноиды** | 5% раствор алюминия хлорида (III) в 95% спирте этиловом |
| **Аминокислоты** | 0,2%-ный раствор нингидрина в 70% спирте этиловом |

## 2.7.Физико-химические методы

### 2.7.1. Спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой областях света

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-56 («Ломо», Россия). Использовали кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

## 2.8. Методы количественного определения основных групп БАВ бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens*

### 2.8.1. Определение количественного содержания тритерпеновых сапонинов

***Метод прямой спектрофотометрический***

Для получения извлечения около 1,0 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц 3 мм, помещали в колбу с обратным холодильником и экстрагировали 96% спиртом этиловым на водяной бане в течение 30 мин с момента закипания экстрагента. Извлечение в горячем виде фильтровали через бумажный фильтр, который возвращали в колбу с сырьем. Экстракцию повторяли дважды в тех же условиях. Фильтраты объединяли и замеряли точный объем извлечения.

Оптическую плотность извлечений измеряли при длине волны 286 нм на приборе СФ-56 в кювете с толщиной слоя 10 мм. При величинах оптической плотности (D) более 0,8 необходимо проводить разведение извлечений. Определение суммы тритерпеновых сапонинов осуществляли в пересчете на бетулин. Раствор сравнения – 96% спирт этиловый.

**Расчет содержания тритерпеновых сапонинов производили по формуле:**

$$X = D \times V_{изв} \times V_{разв} \times m_1 \times 100 / D_0 \times V_{ал} \times m \times V \times (100 - w), \text{ где}$$

D – оптическая плотность анализируемого раствора;

$V_{изв}$ – объем анализируемого извлечения, мл;

$V_{разв}$– объем разведения анализируемого извлечения, мл;

$m_1$ - навеска ГСО бетулина, г;

$D_0$ – оптическая плотность раствора ГСО бетулина;

$V_{ал}$ – объем аликвоты анализируемого извлечения, мл;

m – навеска сырья, г;

V - объем раствора ГСО бетулина, мл;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

### 2.8.2. Определение количественного содержания гидроксикоричных кислот

***Прямой спектрофотометрический метод***

Для получения извлечения аналитическую пробу сырья около 1,0 г сырья (точная навеска), измельченную до размера частиц 3 мм, помещали в колбу с обратным холодильником и экстрагировали последовательно 96%, а потом 70% спиртом этиловым. Экстракцию проводили на водяной бане в течение 30 минут с момента закипания экстрагента. Экстракцию проводили трижды для каждого экстрагента. Извлечения в горячем виде фильтровали через бумажный фильтр и замеряли точный объем извлечения.

Оптическую плотность извлечений измеряли при длине волны 326 нм на приборе СФ-56 в кювете с толщиной слоя 10 мм. При величинах оптической плотности (D) более 0,8 необходимо проводить разведение извлечений. Определение суммы гидроксикоричных кислот осуществляли в пересчете на кислоту хлорогеновую. Раствор сравнения – 96% и 70% спирт этиловый.

**Расчет содержания гидроксикоричных кислот производили по формуле:**

$$X=D\times V\times 100/K\times m\times(100-W), \text{ где}$$

V – объем, полученного извлечения из сырья, мл;

K – коэффициент пропорциональности, рассчитанный по калибровочному графику, построенному по стандартному веществу – кислоте хлорогеновой;

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья,%.

X=X1+X2

X- общее содержание гидроксикоричных кислот;

X1 – содержание гидроксикоричных кислот в 96% спиртовом извлечении;

X2 - содержание гидроксикоричных кислот в 70% спиртовом извлечении.

### 2.8.3. Определение количественного содержания кумаринов

Определение содержания кумаринов проводили прямым спектрофотометрическим методом в:

1. суммарном извлечении, полученном при экстракции сырья 70% спиртом этиловым (без очистки от сопутсвующих веществ);
2. суммарном извлечении, полученном при экстракции сырья 70% спиртом этиловым извлечении, очищенном от сопутствующих веществ.

#### *2.8.3.1. Определения содержания кумаринов в исходном извлечении*

Около 0,25 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц 3 мм, экстрагировали трехкратно 50 мл 70% спирта этилового. Для этого в плоскодонную коническую колбу вместимостью 100 мл помещали навеску сырья, колбу присоединяли к обратному холодильнику и выдерживали на водяной бане в течение 30 мин с момента закипания экстрагента. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр, фильтр возвращали в колбу с сырьем. Извлечение повторяли дважды в тех же условиях. Фильтраты объединяли и замеряли объем полученного извлечения.

Определение суммы кумаринов в пересчете на кумарин проводили прямым спектрофотометрическим методом в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 273 нм на приборе СФ-56. В качестве раствора сравнения использовали 70% спирт этиловый.

**Содержание кумаринов в пересчете на кумарин рассчитывают по формуле:**

$$X=D\times V\times 100\%/K\times m\times(100-W), \text{ где}$$

V – объем извлечения, полученного из сырья, мл;

K – коэффициент пропорциональности, рассчитанный по калибровочному графику, построенному по стандартному веществу – кумарину (ГСО);

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

### *2.8.3.2. Очистка суммы кумаринов от сопутствующих соединений и их спектрофотометрическое определение* [204]

Получение извлечения: извлечение получали по схеме, приведенной в методе 1.

К объединенному фильтрату добавляли 5 мл 10% раствора свинца ацетата основного. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и выдерживали на водяной бане в течение 3 минут с момента закипания экстрагента. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр. Осадок, фильтр и колбу промывали 70% спиртом этиловым (горячим).

К полученному фильтрату добавляли 1 г натрия фосфата однозамещенного и выдерживали с обратным холодильником на водяной бане в течение 3 мин. Осадок, фильтр и колбу промывали 70% спиртом этиловым (горячим). Из фильтрата удаляли спирт этиловый и прибавляли хлороформ.

Содержимое колбы количественно переносили в делительную воронку и трижды экстрагировали хлороформом. К объединенному хлороформному извлечению добавляли 5 г натрия сульфата безводного и выдерживали 12 ч. Затем хлороформное извлечение фильтровали через бумажный фильтр. Фильтр и осадок на нем промывали хлороформом. Фильтрат упаривали досуха. Сухой осадок растворяли в 10 мл 96% спирта этилового.

Определение суммы кумаринов в пересчете на кумарин проводили прямым спектрофотометрическим методом в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 273 нм на приборе СФ-56. В качестве раствора сравнения использовали 96% спирт этиловый. Расчетная формула приведена выше.

**Содержание кумаринов в пересчете на кумарин рассчитывают по формуле:**

$$X=D\times V\times 100\%/K\times m\times(100-W), \text{ где}$$

V – объем исследуемого раствора, мл;

K – коэффициент пропорциональности, рассчитанный по калибровочному графику, построенному по стандартному веществу – кумарину (ГСО);

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

## 2.8.4. Определение содержания полифенольных окисляемых веществ (дубильных веществ)

Определение содержания дубильных веществ проводили двумя методами:

1) фармакопейным методом (ГФ XI) [41];

2) прямым спектрофотометрическим методом.

***Прямой спектрофотометрический метод (2.8.4.2)***

Получение извлечения: около 1 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц 3 мм, помещали в коническую колбу объемом 50 мл, заливали 30 мл воды очищенной, колбу присоединяли к обратному холодильнику и выдерживали на водяной бане в течение 30 мин с момента закипания экстрагента. Извлечение в горячем виде фильтровали через бумажный фильтр, который возвращали в колбу с сырьем. Экстракцию повторяли дважды в тех же условиях. Фильтраты объединяли и замеряли точный объем извлечения.

Определение суммы дубильных веществ проводили в пересчете на танин в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 275 нм на приборе СФ-56. Раствор сравнения – вода очищенная.

**Расчет содержания дубильных веществ в пересчете на танин осуществляли по формуле:**

$$X=D\times V\times 100\%/K\times m\times(100-W),$$ где

V – объем извлечения, полученного из сырья, мл;

K – коэффициент пропорциональности, рассчитанный по калибровочному графику, построенному по стандартному веществу – танину;

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

## 2.8.5. Определение количественного содержания аминокислот

***Спектрофотометрический метод определения* [4, 67, 69]**

Извлечение получали следующим способом: около 1 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц 3 мм, помещали в коническую колбу объемом 50 мл и экстрагировали последовательно 96%, 70, 40, 20%, водой очищенной по 30 мл, каждый раз нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 мин с момента закипания экстрагента. Полученные извлечения фильтровали через бумажный фильтр и замеряли точный объем извлечения.

К 2 мл каждого полученного извлечения прибавляли 2 мл 0,2% раствора нингидрина, смесь нагревали на кипящей водяной бане 15 мин.

При определении содержания аминокислот в сухих экстрактах, полученных из бересты КИ и МХИ около 0,02 г (точная навеска) сухого экстракта заливали 30

мл 20% спирта этилового, перемешивали до растворения и проводили нингидриновую реакцию указанным выше способом.

Определение суммы аминокислот проводили прямым спектрофотометрическим методом в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 231 нм на приборе СФ-56 в пересчете на аланин. Раствор сравнения – 2 мл извлечения с 2 мл соответствующего экстрагента (вода очищенная или водно-этанольные смеси с содержанием спирта этилового 20%, 40%, 70%, 96%).

Параллельно определяли оптическую плотность комплекса стандартного образца аланина с нингидрином. Для этого около 0,001 г (точная навеска) аланина помещали в мерную колбу на 25 мл, приливали 20 мл воды очищенной и тщательно перемешивали до полного растворения вещества. Затем доводили до метки водой. Из полученного раствора отбирали аликвоту 2 мл и добавляли к ней 2 мл 0,2% раствора нингидрина, перемешивали и нагревали на кипящей водяной бане 15 мин. В качестве раствора сравнения использовали 2 мл воды очищенной с 2 мл раствора аланина.

Расчет содержания аминокислот в пересчете на аланин осуществляют по формуле:

$$X=D_1\times V_1\times V_4\times V_5\times m_1\times 100\times 100\%/D_2\times V_2\times V_3\times V_6\times m_2\times(100-W),$$ где

$D_1$ – оптическая плотность исследуемого раствора;

$D_2$ – оптическая плотность РСО аланина;

$V_1$ – объем полученного извлечения из сырья, мл;

$V_2$ – объем полученного раствора аланина, мл;

$V_3$ – аликвота извлечения, мл;

$V_4$ – разведение извлечения;

$V_5$ – аликвота раствора РСО аланина, мл;

$V_6$ – разведение раствора РСО аланина;

$m_1$ – масса РСО аланина, г;

$m_2$ – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

$$X_{ОБ.}= X_{96\%}+X_{70\%}+X_{40\%}+X_{20\%}+X_{H2O},$$ где

$X_{ОБ.}$ - общее содержание аминокислот;

$X_{96\%}$ - содержание аминокислот в 96% спиртовом извлечении;

$X_{70\%}$ - содержание аминокислот в 70% спиртовом извлечении;

$X_{40\%}$ - содержание аминокислот в 40% спиртовом извлечении;

$X_{20\%}$ - содержание аминокислот в 20% спиртовом извлечении;

$X_{H2O}$ - содержание аминокислот в водном извлечении.

### 2.8.6. Определение качественного состава и количественного содержания макро- и микроэлементов

Определение качественного состава и количественного содержания макро- и микроэлементов проводилось методом масс-спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на приборе «ELAN-DRC» в ООО «Химико-аналитический центр «Плазма» (г. Томск).

Высушенные образцы сырья и экстракта измельчали до частиц размером менее 1 мм, предварительно подвергали мокрому озолению смесью кислот в фарфоровых тиглях. Контроль проводился методом добавок [123].

## 2.9. Методы товароведческого анализа

В работе использовались методы товароведческого анализа, соответствующие требованиям нормативной документации (табл. 2.7).

Таблица 2.7

**Методы товароведческого анализа сырья**

| Показатели | Нормативная документация |
|---|---|
| Товароведческий анализ и отбор проб сырья | ОФС 42-0013-03 «Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб» (2003) [129] и ГФ XI [41] |
| Зола общая | ГФ XII «Общая зола» (ОФС 42-0055-07) [40] |
| Влажность | ГФ XI «Определение влажности лекарственного растительного сырья» [41] |
| Ситовой анализ | ГФ XI «Определение измельченности» [41] |
| Примеси | ГФ XI «Определение содержания примесей» [41] |
| Составление проекта нормативной документации – фармакопейной статьи на сырье | ОСТ 91.500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» (2000) [128] |

## 2.10. Методы определения показателей качества

Для сырья и экстрактов были установлены следующие показатели качества (табл. 2.8):

Таблица 2.8

**Показатели качества сырья и сухих экстрактов**

| Показатели качества | Нормативная документация |
|---|---|
| **Содержание тяжелых металлов** | ГФ XII «Тяжелые металлы» (ОФС 42-0059-07) [40] |

| | |
|---|---|
| **Микробиологическая чистота** | ГФ XII «Микробиологическая чистота» (ОФС 42-0067-07) [40] |
| **Срок годности** | ГФ XII «Сроки годности лекарственных средств» (ОФС 42-0075-07) [40] |

## 2.11. Получение сухого экстракта из бересты, измельченной классическим способом (КИ) и механохимической активацией (МХИ)

Воздушно сухую бересту, измельченную до размера частиц 3 мм (КИ) и до порошка с преобладанием фракции размером 0,315 мм (МХИ) помещали в колбу, заливали 20% спиртом этиловым (80% спиртом этиловым) в соотношении 1:40 и трижды экстрагировали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин при 90-92ºС. Полученные извлечения фильтровали через бумажный фильтр. Объединенные фильтраты отстаивали в холодильной камере при температуре не выше 10 ºС в течение 48 часов до получения прозрачной жидкости, которую затем отделяли от осадка фильтрованием. Из объединенных очищенных фильтратов удаляли экстрагент на роторном испарителе до сиропообразной консистенции. Затем экстракт подвергали сушке. В сухих экстрактах (КИБЭ20, КИБЭ80, МХИБЭ20, МХИБЭ80) определяют содержание влаги, золы общей, основных групп БАВ и макро- и микроэлементов.

## 2.12. Методы фармакологических исследований

### 2.12.1. Условия содержания и правила проведения экспериментов с лабораторными животными

Работа выполнена на белых беспородных крысах-самцах (масса тела 200-250 г) мыщах-самцах (масса тела 18-20 г), полученных из вивария ГБОУ ВПО НГМУ МЗ РФ, где содержались в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) при температуре воздуха 20-22 ºС, влажности не более 50%, объеме воздухообмена (вытяжка-приток) 8:10, в хорошо освещенном помещении при обычном световом режиме (день-ночь), в стандартных пластиковых клетках с подстилкой из мелкой древесной стружки по 8-10 особей в клетке на гранулированном комбикорме «ПК 120-3» («Лабораторснаб») и воде ad libitum. Все экспериментальные воздействия и взятие образцов проводили в одно и то же время.

Эксперименты выполнялись на кафедре фармакологии ГБОУ ВПО НГМУ МЗ РФ под руководством д.м.н., проф. О.Р. Грека.

Экспериментальные исследования проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденные Министерством здравоохранения РФ, в соответствии с Методическими рекомендациями «Деонтология медико-биологического эксперимента» (1987), а также с соблюдением правил гуманного обращения с животными (Report of the AVMA Panel on Euthanasia JAVMA, 2001).

### 2.12.2. Исследование острой токсичности ($LD_{50}$) КИБЭ20 и МХИБЭ20

Проводили на 30 беспородных белых мышах-самцах средней массой 18 – 20 г. КИБЭ20 и МХИБЭ20 вводили однократно в желудок через зонд в виде водного раствора в дозах от 1000 до 5000 мг/кг. Проводили необходимые наблюдения в течение 14 дней. Отмечали отсутствие или наличие случаев летальности животных. По результатам эксперимента определяли класс опасности исследуемых объектов [6, 149].

### 2.12.3. Оценка противовоспалительной активности МХИБЭ20

Противовоспалительные свойства исследовали согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [170]. МХИБЭ20 в виде водного раствора вводили крысам через зонд внутрижелудочно в течение 7 дней ежедневно в дозах 50, 100, 150 мг/кг массы тела животного. В качестве препарата сравнения использовали кислоту ацетилсалициловую (АК). АК вводили внутрижелудочно в дозе 20 мг/кг массы тела животного. Контрольная группа получала эквивалентный объем воды очищенной. Каждый препарат вводили группам из 6 крыс-самцов.

Оценку противовоспалительной активности МХИБЭ20 проводили на двух моделях:

1. ***Модель «каррагенинового отека»*** (острое асептическое воспаление) - вызывали введением под плантарный апонефроз задней правой лапы 0,1 мл 1 % раствора каррагенина (w/v) за 3,5 ч до определения отека. Величину отека определяли на пике воспаления по объему вытесненной воды (мл) лапой.
2. ***Модель «ватной гранулемы»*** (пролиферативное хроническое воспаление) - стерильный ватный тампон (10 мг) имплантировали с помощью иглы (А1-20х40-1,17И25) крысам под кожу передних лап. На 8 сутки животных умерщвляли декапитацией под эфирным наркозом, гранулему вычленяли, взвешивали в сыром и затем высушенном виде (при 60 ºС до постоянного веса). Пролиферативную реакцию оценивали по разнице между массой высушенной

гранулемы и исходной массой ватного тампона, экссудативную реакцию – по разнице между массами сырой и высушенной гранулемы.

Статистическую обработку полученных результатов проводили путем расчета средней и средней квадратичной ошибки. О достоверности различий судили, используя параметрический критерий Стьюдента. Значимость различий считали достоверной при $P \leq 0,05$.

### 12.2.4. Оценка гепатопротекторной активности сухих экстрактов бересты

#### *12.2.4.1. Оценка гепатопротекторной активности МХИБЭ20 на модели экспериментального токсического повреждения печени, вызванного введением парацетамола*

Токсическое поражение печени моделировали у крыс-самцов массой 200-250 г путем внутрижелудочного (в/ж) введения парацетамола в крахмальной слизи.

Животные были разделены на 4 группы по 10 особей в каждой. Животные I группы получали только парацетамол (негативный контроль), II группы – препарат сравнения карсил в дозе 100 мг/кг (референтная группа), III группы – МХИБЭ20 в дозе 100 мг/кг, IV группы – служили позитивным контролем (интактные животные). МХИБЭ20 и препарат сравнения карсил («Sopharma») профилактически вводили в течение 3-х суток однократно; на 4-е и 5-е сутки в/ж вводили парацетамол (ОАО «Верофарм») в дозе 200 мг/кг; на 7-е сутки после введения парацетамола животных выводили из эксперимента.

Перед декапитацией животных лишали корма на 12 ч, забор материала проводили в утренние часы. Животных декапитировали под эфирным наркозом.

Оценку гепатопротекторной активности МХИБЭ20 проводили на основе биохимических показателей (АлТ, мочевина, белковые фракции, ММП-2,7) и морфологических данных печени.

Активность ММП-2,7 в образцах сыворотки крови определяли с использованием флуоресцентного субстрата (Calbiochem, США) по методу Nagase et al.[276]. Содержание белковых фракций в сыворотке крови крыс оценивали методом электрофореза на ацетат-целлюлозных пленках [214], содержание общего белка – биуретовым методом [290].

Концентрацию билирубина, мочевины, АлТ определяли с использованием наборов (PLIVA-Lachema Diagnosticum, Чехия).

#### *12.2.4.2. Оценка гепатопротекторной активности*

***КИБЭ20 и МХИБЭ20 на модели экспериментального острого токсического повреждения печени, вызванного введением четыреххлористого углерода***

Действие экстрактов КИБЭ20 и МХИБЭ20 изучали на модели тетрахлорметанового гепатита. Гепатит моделировали интраперитонеальным введением 50% масляного раствора $CCl_4$ в дозе 0,2 мл/100 г массы животного однократно. Для изучения гепатозащитного действия КИБЭ20 крысы - самцы массой 200-250 г были разделены на 5 групп: I – позитивный контроль (интактные животные); II - негативный контроль (тетрахлорметан); III, IV - перед введением $CCL_4$ вводили КИБЭ20 в дозе 100 и 50 мг/кг; V - перед введением $CCL_4$ вводили карсил в дозе 100 мг/кг. КИБЭ20 и препарат сравнения карсил профилактически вводили внутрижелудочно однократно в течение 5-ти суток. На 6-е сутки интраперитонеально вводили 50% масляный раствор $CCL_4$ в дозе 0,2 мл/100 г. На 4 - е сутки после введения $CCL_4$ животных выводили из эксперимента. Гепатопротекторное действие МХИБЭ20 (100 и 50 мг/кг) изучали на крысах - самцах массой 200-250 г, разделенных также на 5 групп (по выше указанной схеме). Перед декапитацией животных лишали корма на 12 ч, забор материала проводили в утренние часы.

Оценку гепатопротекторной активности экстрактов проводили на основе биохимических показателей (АлТ, общий белок, белковые фракции, ММП-2,7) и морфологических данных печени.

### *12.2.4.3. Методика морфологического исследования*

Для светооптического исследования печень экспериментальных животных фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Для дальнейшей гистологической обработки вырезали из большой доли печени образцы толщиной 6-7 мм путем поперечного рассечения, подвергали стандартной обработке на гистологическом комплексе MICROM («Карл Цейс», Германия): обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации с последующей заливкой в парафиновые блоки. Срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином Лилли-Майера и 1% эозином на автомате HMS-70 (время окраски – 1 ч 15 мин) [27, 110, 111]. Гистологические препараты изучали на световом микроскопе CARL ZEISS Primastar при увеличении 100 и 400 раз.

Морфометрическое исследование гистологических образцов проводили согласно основным принципам стереологии в морфометрии [3, 79, 115, 197, 217, 289]. При помощи морфометрической сетки из 25 точек (16 квадратов), вставленной в окуляр, подсчитывали численную плотность двуядерных

гепатоцитов (Nai) в паренхиме печени на единицу тестовой площади 1600 мкм$^2$, объемные плотности (Vv, %) очагов некрозов и дистрофически измененных гепатоцитов [79, 115, 197, 217].

## 2.13. Статистические методы

Для обработки полученных результатов использовали программы: Waters Breeze2 Software, Bruker, IR SOLUTION. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программ статистической обработки данных Statistica MS Excel. Для выявления статистической значимости различий использовали параметрический критерий Стьюдента. Различия сравниваемых величин считали достоверными при $p \leq 0,05$ [10].

## 2.14. Стандартные образцы веществ сравнения (СОВС)

В работе использовались следующие СОВС:

- тритерпеновые сапонины – бетулин;
- гидроксикоричные кислоты – *п*-окси-бензойная, кофейная, *транс*-коричная, ферулловая, хлорогеновая,;
- фенолкарбоновые кислоты – галловая;
- кумарины – эскулин, скополетин, скопорон, герниарин, кумарин, эскулетин, умбеллиферон (Aldrich);
- аминокислоты – валин, глутаминовая кислота, триптофан, аланин, серин, гистидин, пролин, лейцин, метионин, глутамин, аспарагиновая кислота, лизин, треонин, цистеин, орнитин, изолейцин, глицин, норвалин, фенилаланин, орнитин.

# ГЛАВА 3
# ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕРЕСТЫ

## 3.1.Общий фитохимический анализ бересты *Betula pendula* Roth. и *Betula pubescens* Ehrh.

Общий фитохимический анализ образцов бересты *B. pendula* и *B. pubescens* показал наличие первичных (аминокислоты, полисахариды) и вторичных метаболитов (тритерпеновые сапонины, полифенольные окисляемые вещества (дубильные вещества преимущественно гидролизуемой группы), флавоноиды, кумарины, гидроксикоричные кислоты) (табл.3.1).

Таблица 3.1

**Результаты общего фитохимического анализа образцов бересты *B. pendula* и *B. pubescens*, собранных из различных мест произрастания**

| Качественная реакция, реактив | Образцы* | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** |
| **Тритерпеновые сапонины** | | | | | | | | |
| Пенообразования | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Реакция *Лафона* | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 25%-ный раствор кислоты фосфорновольфрамовой | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 10%-ный раствор кислоты фосфорномолибденовой | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **Дубильные вещества** | | | | | | | | |
| 10% водный раствор $FeNH_4(SO_4)_2$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Бромная вода | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 10% раствор $CH_3COOH$ и 10% раствор $Pb(CH_3COO)_2$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 1% раствор $FeNH_4(SO_4)_2$ и 10% раствор $Pb(CH_3COO)_2$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **Флавоноиды** | | | | | | | | |
| Проба *Chinoda* | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 5% раствор $AlCl_3$ | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **Кумарины** | | | | | | | | |
| Лактонная проба | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Реакция *Паули* | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **Гидроксикоричные кислоты** | | | | | | | | |
| Реакция *Паули* | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **Алкалоиды** | | | | | | | | |
| Общеосадительные реактивы: *Драгендорфа, Вагнера, Бушарда, Майера, Марме* | - | - | - | - | - | - | - | - |
| **Полисахариды** | | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 95% спирт этиловый (1:3) | + | + | + | + | + | + | + | + |
| **Аминокислоты** | | | | | | | | |
| Реакция *Руэмана* | + | + | + | + | + | + | + | + |

Примечание*: 1 – береста *B. pendula*, березовый колок, Буготагские сопки (НСО); 2 - береста *B. pendula,* березовый лес, Колыванский район (НСО); 3 - береста *B. pendula*, березовый лес, Иркутская область; 4 - береста *B. pendula*, березовый колок, Венгеровский район (НСО); 5 – *береста B. pubescens,* Кудряшовский бор (НСО); 6 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Алтайский край; 7 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Костромская область; 8 - береста *B. pubescens,* опушка леса, Пермский край.

Сравнительный анализ результатов общего фитохимического анализа образцов бересты *B. pendula* и *B. pubescens*, собранных из различных точек ареала, показал их идентичность по основным группам БАВ (табл.3.1).

В проявлении биологической активности растения участвуют все группы БАВ, поэтому представляет интерес дальнейшего исследования состава компонентов и количественного содержания каждой группы веществ.

## 3.2. Тритерпеновые сапонины

### Анализ качественного состава и количественного содержания

Одной из основных групп БАВ бересты являются тритерпеновые сапонины, а именно бетулин.

Методом 2.5.1.а выделено две фракции из образца бересты *B. pendula* (№2): фракция №1 – освобождена от кислых веществ и фракция №2 – освобождена от кислых веществ и перекристаллизована из изопропилового спирта.

Методом ТСХ подтверждено присутствие и преобладание бетулина во фракциях №№1 и 2 (табл. 3.2, рис. 3.1. (см.в прил.).

Таблица 3.2

**Результаты хроматографического исследования фракции №№ 1 и 2**

| Система | Детектор | Окраска пятен | Rf | Вещество |
|---|---|---|---|---|
| Бутанол - этанол - аммиак (7:2:5) | 25%-ный раствор кислоты фосфорновольфрамовой в 95% спирте этиловом | оранжевая | 0,96 | Бетулин |
| | 10%-ный раствор кислоты фосфорномолибденовой в 95% спирте этиловом | синяя | 0,96 | Бетулин |

Выделенные из экстракта бересты фракции №№1 и 2 являются бетулином, что подтверждается идентичностью их ЯМР – спектров (рис. 3.2; 3.3; 3.4; 3.5) с ЯМР – спектром РСО бетулина (рис. 3.6).

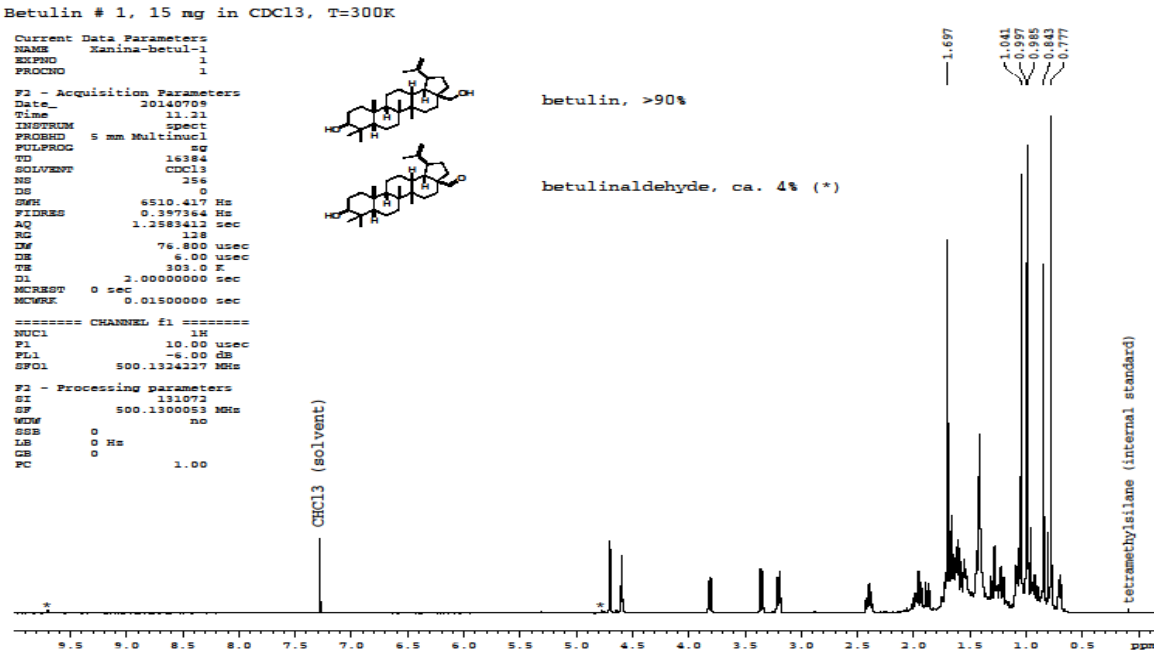



**Рисунок 3.2**. ЯМР-спектр фракции №1 на ядре изотопа водорода Н-1.

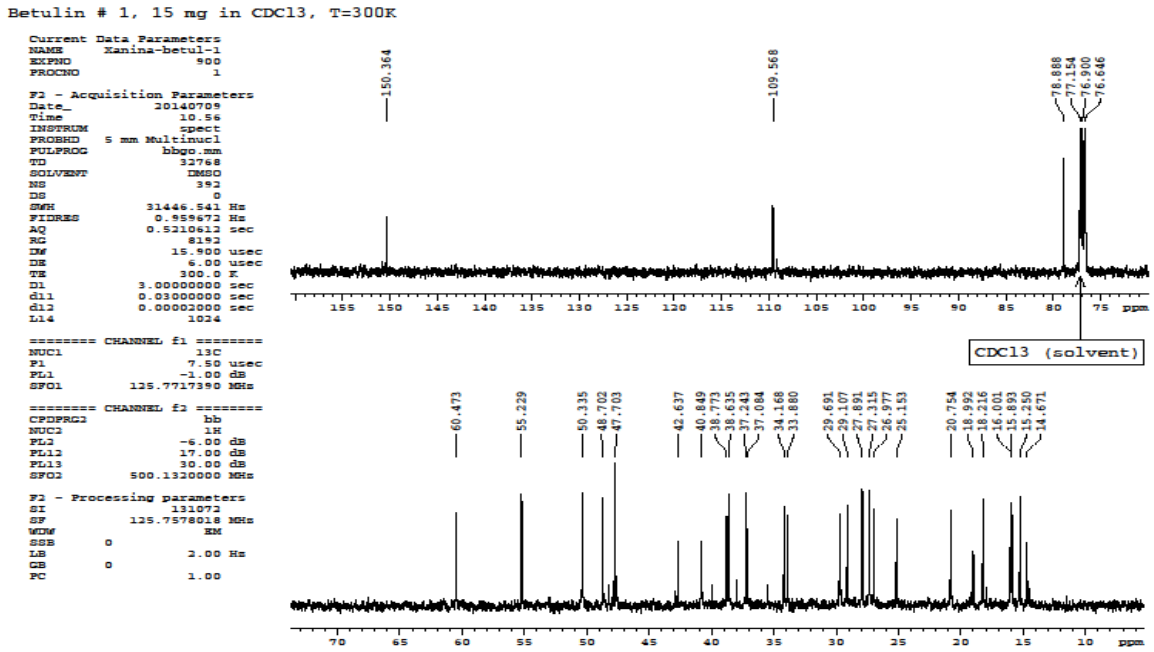



**Рисунок 3.3.** ЯМР-спектр фракции №1 на ядре изотопа углерода С-13.

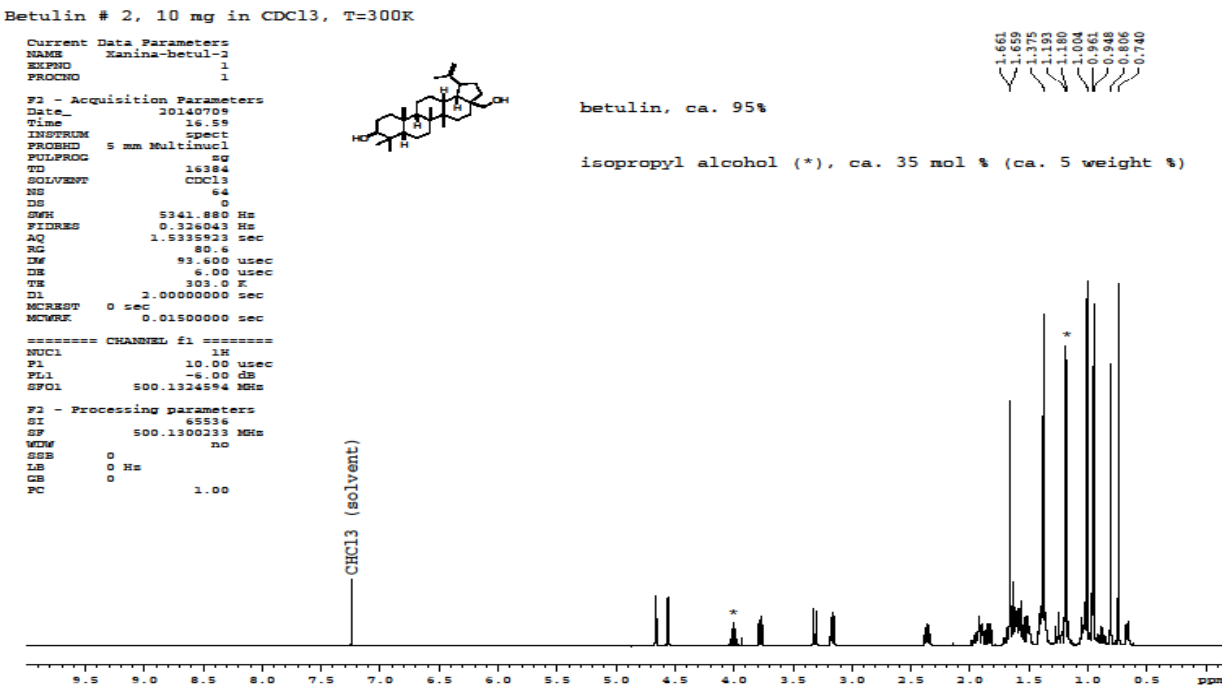



**Рисунок 3.4.** ЯМР-спектр фракции №2 на ядре изотопа водорода H-1.

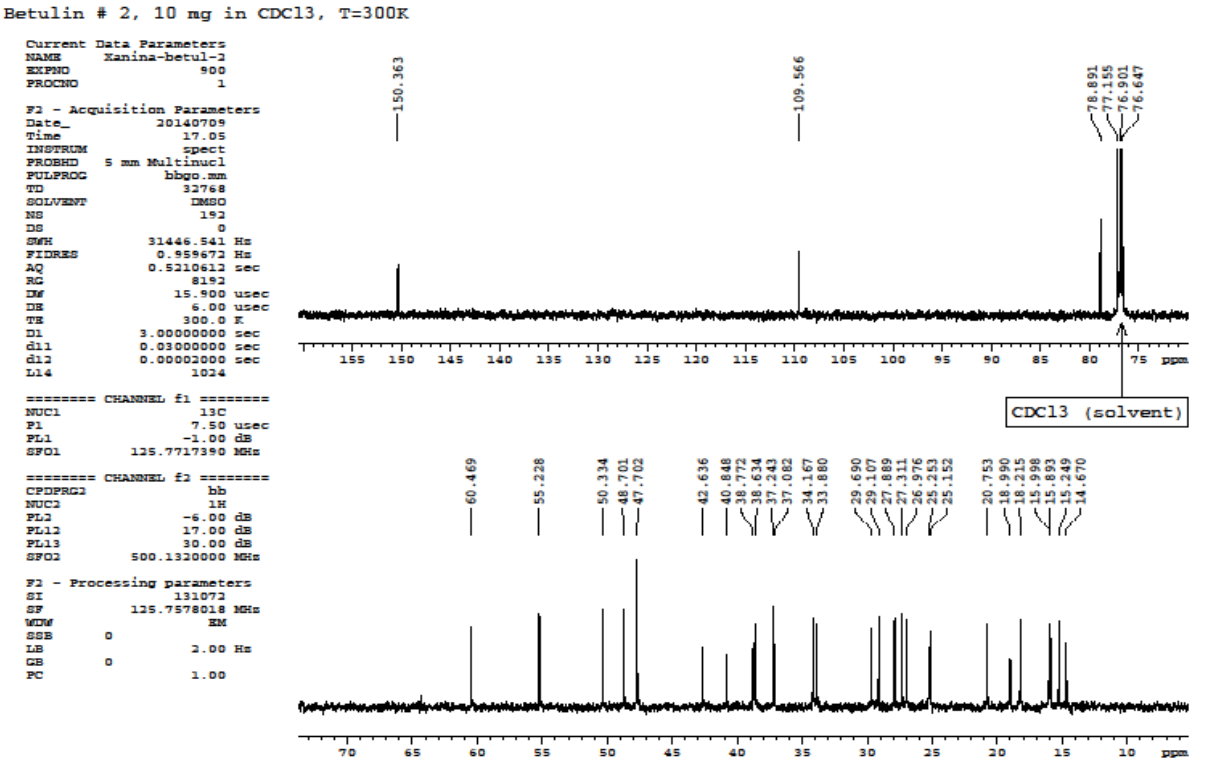



**Рисунок 3.5.** ЯМР-спектр фракции №2 на ядре изотопа углерода C-13.

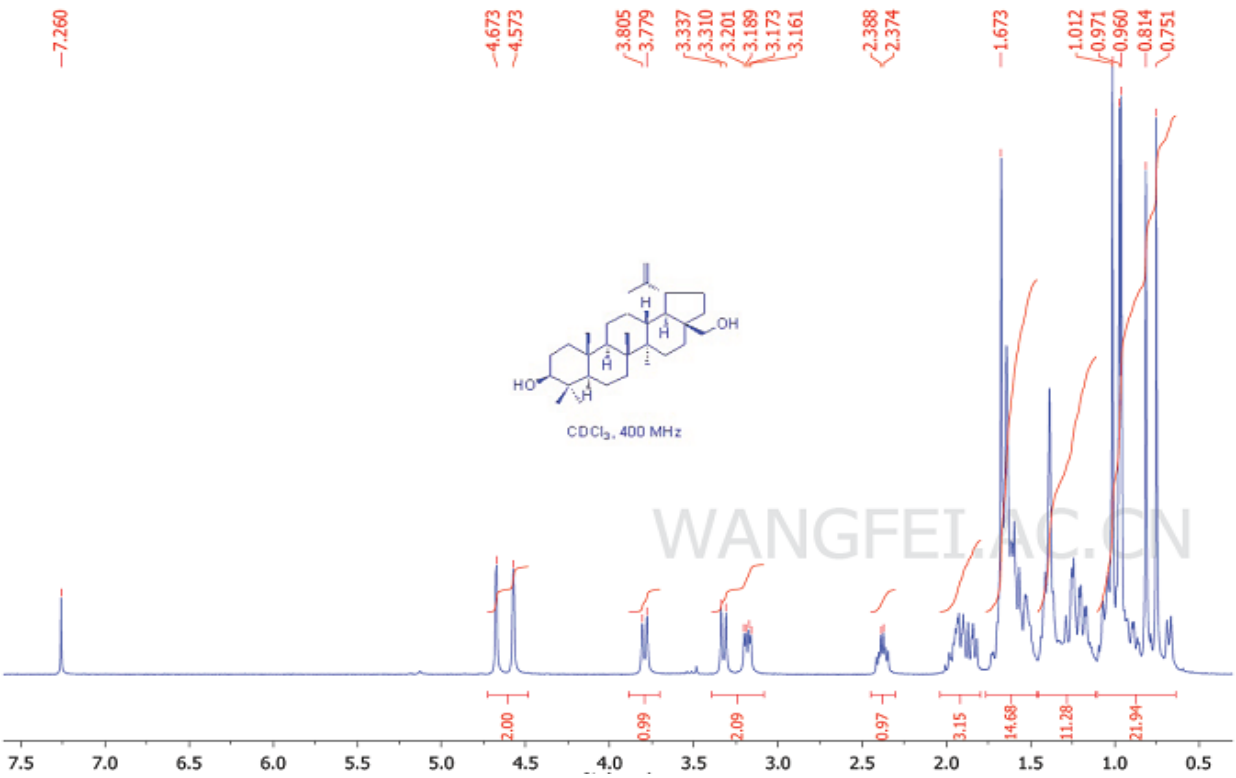



**Рисунок 3.6.** ЯМР-спектр РСО бетулина.

По данным ЯМР-спектров фракция №1 содержит около 90% бетулина и примеси других тритерпеноидов (около 4% - бетулиновый альдегид). Фракция №2 на 95% состоит из бетулина и около 35 мольных % изопропилового спирта (около 5 весовых %).

При сравнительном анализе электронных спектров поглощения анализируемых фракций в 96% спирте этиловом, 96% спиртовых суммарных извлечений из образцов бересты *B. pendula* (№2) и *B. pubescens* (№5) со спиртовым раствором РСО бетулина выявили идентичность их электронных спектров поглощения в УФ области света (рис. 3.7).

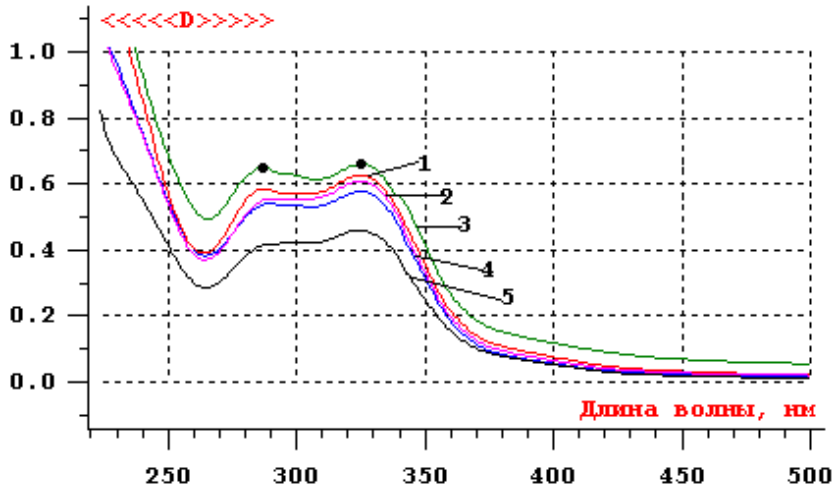



**Рисунок 3.7.** Электронные спектры поглощения: **1, 2** - фракций №№ 1 и 2;

**3** - стандартного образца бетулина (в 96% спирте этиловом) и **4, 5** - суммарных извлечений, полученных из образцов бересты №№ 2 и 5 с использованием 96% спирта этилового (max = 286 нм)

Поскольку в образцах бересты №№ 2 и 5 методами ТСХ, ЯМР – спектроскопией, УФ-спектроскопией установлено присутствие бетулина и преобладание его в сумме тритерпеновых соединений, то расчет количественного содержания тритерпеновых соединений в исследуемых образцах бересты (№№1 – 8) проведен в пересчете на бетулин. Для этого параллельно с анализируемыми растворами определяли оптическую плотность стандартного раствора бетулина.

**Содержание суммы тритерпеновых сапонинов (X) рассчитывали в процентах в пересчете на абсолютно-сухое сырье по формуле:**

$$X = D \times V_{изв} \times V_{разв} \times m_1 \times 100 / D_0 \times V_{ал} \times m \times V \times (100 - w), \text{ где}$$

D – оптическая плотность анализируемого раствора;

$V_{изв}$ – объем анализируемого извлечения, мл;

$V_{разв}$– объем разведения анализируемого извлечения, мл;

$m_1$ - навеска ГСО бетулина, г;

$D_0$ – оптическая плотность раствора ГСО бетулина;

$V_{ал}$ – объем аликвоты анализируемого извлечения, мл;

m – навеска сырья, г;

V - объем раствора ГСО бетулина, мл;

W – потеря в массе при высушивании, %.

*Примечание:*

Приготовление раствора ГСО бетулина: 0,0617 г (точная навеска) ГСО бетулина помещают в мерную колбу на 25 мл, приливают 15 мл 96% спирта этилового, тщательно перемешивают (слегка нагревают на водяной бане, затем раствор охлаждают до комнатной температуры), доводят до метки 96% спиртом этиловым и перемешивают.

Таблица 3.3

**Содержание тритерпеновых сапонинов в образцах бересты *B. pendula* и *B. pubescens* в зависимости от места произрастания**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образцы* | Содержание тритерпеновых сапонинов |
|---|---|
| 1 | 31,24±1,56 |
| 2 | 25,00±1,25 |
| 3 | 18,06±0,91 |
| 4 | 22,03±1,11 |
| 5 | 29,02±1,45 |
| 6 | 21,69±1,08 |

| | |
|---|---|
| 7 | 18,99±0,95 |
| 8 | 36,22±1,81 |

Примечание*: 1 – береста *B. pendula,* березовый колок, Буготагские сопки (НСО); 2 - береста *B. pendula*, березовый лес, Колыванский район (НСО); 3 - береста *B. pendula*, березовый лес, Иркутская область; 4 - береста B. pendula, березовый колок, Венгеровский район (НСО); 5 – береста B. *pubescens,* Кудряшовский бор (НСО); 6 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Алтайский край; 7 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Костромская область; 8 - береста *B. pubescens,* опушка леса, Пермский край.

Анализ данных таблицы 3.3 свидетельствует, что на содержание тритерпеновых сапонинов в бересте значительно влияет как вид березы, так и эколого-географический фактор. При этом возраст бересты оказывает незначительное влияние на накопление тритерпеновых сапонинов в ней (табл. 3.4). Наиболее низкое содержание сапонинов наблюдается на высоте 1,2 м (17,97%) – комлевая часть дерева *B. pendula*, что может объясняться качественными структурными изменениями в коре с возрастом – развивается ритидом, который представлен тканями, отличными от бересты.

Таблица 3.4

**Зависимость содержания тритерпеновых сапонинов от возраста бересты**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Высота (м) | Содержание тритерпеновых сапонинов |
|---|---|
| 1,2 | 17,97±0,90 |
| 2 | 26,21±1,31 |
| 3,2 | 26,80±1,34 |
| 5,7 | 24,26±1,21 |
| 12 | 21,72±1,09 |
| 14 | 22,40±1,12 |

*Примечание:* высота (м) – расстояние от основания ствола дерева до участка на стволе, где были взяты образцы бересты для исследования.

Таким образом, анализ полученных результатов исследования позволяет судить о влиянии вида березы (*B. pendula, B. pubescens*) и георафического фактора на накопление тритерпеновых сапонинов в бересте, их содержание может варьироваться в пределах от 18,06 до 36,22%. Установлено, что возраст бересты значительного влияния не оказывает на содержание тритерпеновых сапонинов, за исключением комлевой части ствола, что необходимо учитывать в процессе заготовки сырья.

## 3.3. Кумарины

### Анализ качественного состава

При хроматографическом исследовании суммы кумаринов, очищенной от сопутствующих веществ, полученной из образцов бересты *B. pendula* (№2) и *B. pubescens* (№5), установлено наличие 10 веществ, из которых идентифицирован кумарин (рис. 3.8; 3.9 (см. в прил.).

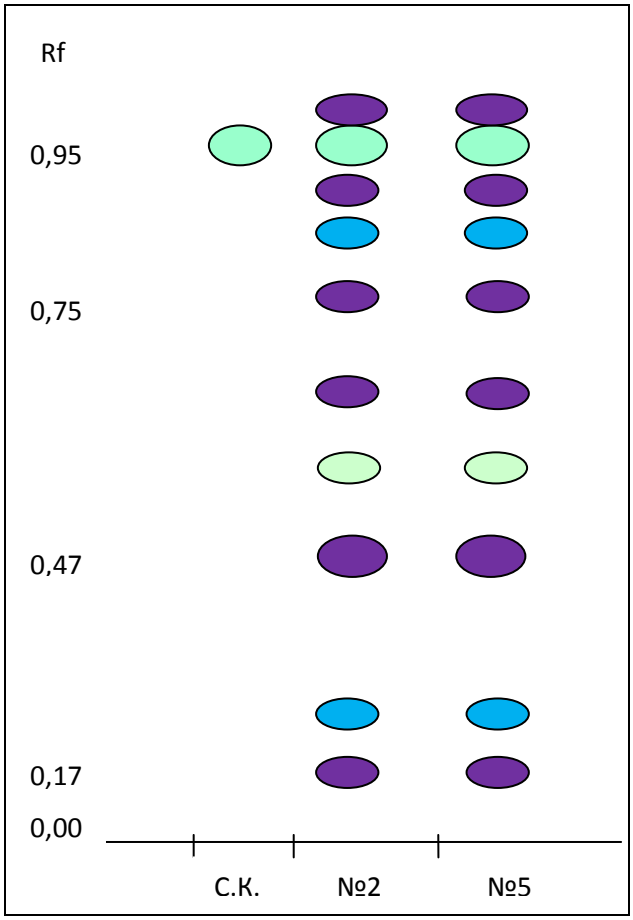



**Рисунок 3.8.** Схема хроматограммы очищенной суммы кумаринов из образцов бересты №2 и №5, свидетеля – кумарина (С.К.)
*Примечание.* Условия хроматографии: пластинка «Sorbfil», система растворителей: толуол-эфир диэтиловый(4:6), насыщенные 10% кислотой уксусной.

Сравнительный хроматографический анализ компонентного состава кумаринов бересты (рис. 3.8) не выявил различий между двумя видами берез *B. pendula* (№2) и *B. pubescens* (№5).

При исследовании влияния эколого-географического фактора на компонентный состав кумаринов бересты установлено, что образцы *B. pendula* и *B. pubescens*, собранные из разных точек ареала по составу кумаринов не различаются как внутри вида, так и внутри рода (табл. 3.5).

Таблица 3.5

**Результаты хроматографического исследования кумаринов в образцах бересты**

| Система | Вещество | Rf | Свечение в УФ - свете | | Окраска пятен после реакции азосочетания | Образцы | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | До | После | | | | | | | | | |
| | | | обработки 5% спиртовым раствором NaOH | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| **толуол-эфир диэтиловый (4:6), насыщенные 10% кислотой уксусной** | Не идентифицировано | 0,17 | | фиолетовое | розовое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,26 | | голубое | желтое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,47 | голубое | фиолетовое | розовое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,53 | | зелено-голубое | желтое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,62 | фиолетовое | фиолетовое | оранжевое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,75 | фиолетовое | фиолетовое | оранжевое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,81 | | голубое | желтое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,85 | | фиолетовое | розовое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Кумарин | 0,95 | голубое | зелено-голубое | оранжевая | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,98 | фиолетовое | фиолетовое | желтая | + | + | + | + | + | + | + | + |

Обозначения*: 1 – береста *B. pendula*, березовый колок, Буготагские сопки (НСО); 2 - береста *B. pendula,* березовый лес, Колыванский район (НСО); 3 - береста *B. pendula,* березовый лес, Иркутская область; 4 - береста *B. pendula,* березовый колок, Венгеровский район (НСО); 5 – береста *B. pubescens,* Кудряшовский бор (НСО); 6 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Алтайский край; 7 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Костромская область; 8 - береста *B. pubescens,* опушка леса, Пермский край.

Методом препаративной хроматографии (2.4.1.) был выделено вещество х, имеющее наибольшую интенсивность свечения в УФ - свете и совпадающее по величине Rf (0,95) со стандартным веществом - кумарином.

Для идентификации выделенного кумарина использовали УФ- и ИК-спектроскопию.

В ИК-спектре выделенного кумарина идентифицированы полосы поглощения следующих структурных фрагментов (KBr, υ, см$^{-1}$): 1612, 1566, 1446 (Ar), 1734 (>C=O), что сопоставимо со спектральными характеристиками РСО кумарина (рис. 3.9, 3.10).

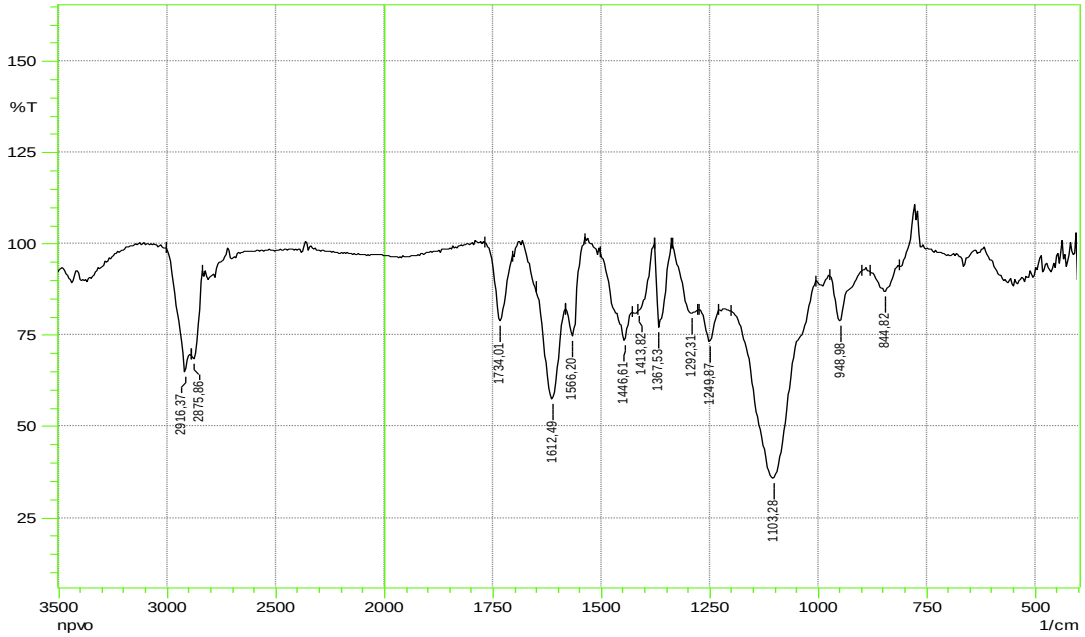



**Рисунок 3.9.** Электронный спектр поглощения (ИК- спектр) кумарина, выделенного из бересты

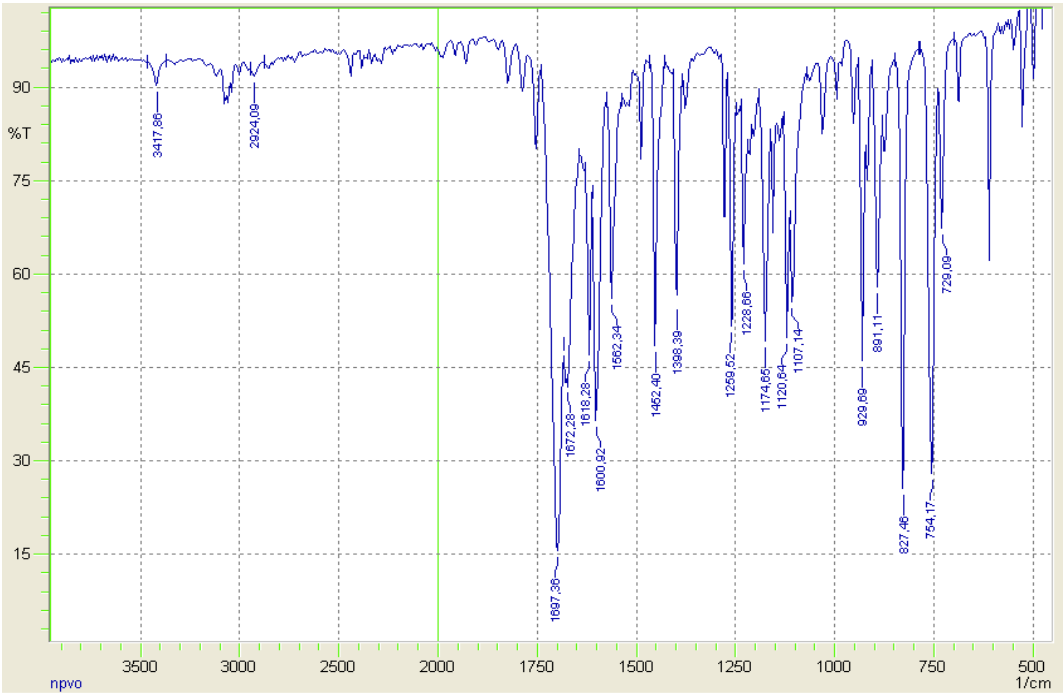


**Рисунок 3.10.** Электронный спектр поглощения (ИК- спектр) ГСО кумарина

Сравнительный анализ электронных спектров поглощения выделенного из исследуемого образца бересты кумарина и спиртового раствора ГСО кумарина показал их близость, что позволяет судить о присутствии и преобладании в сумме кумаринов бересты кумарина (рис. 3.11, 3.12).

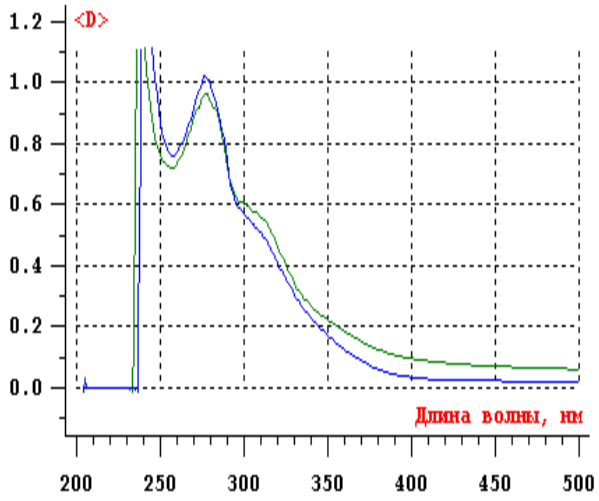



**Рисунок 3.11.** Электронные спектры кумарина, выделенного из бересты (синий) и РСО кумарина (зеленый) в 96% спирте этиловом

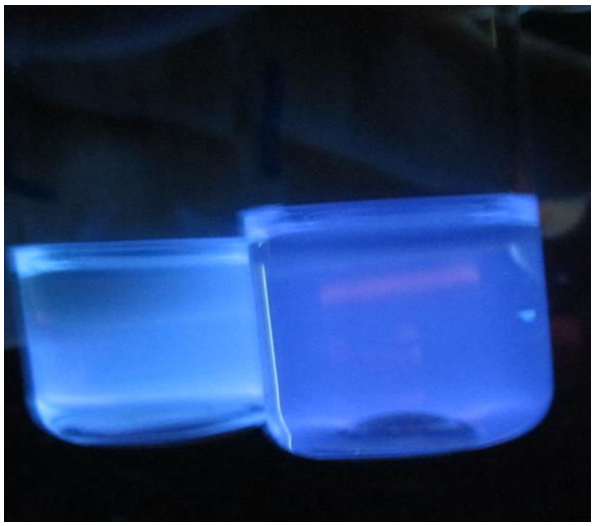


**Рисунок 3.12.** Очищенная сумма кумаринов, выделенная из образцов бересты №№ 2 и 5 в УФ - свете

## Анализ количественного содержания кумаринов

На основании ранее проведенных исследований методами (ТСХ, УФ- и ИК-спектрометрии) было установлено присутствие кумарина и его преобладание в сумме кумаринов бересты, поэтому расчет количественного содержания суммы кумаринов проводили в пересчете на преобладающий компонент (кумарин), имеющий максимумы поглощения при длинах волн 273 и 310 нм (рис.3.13).

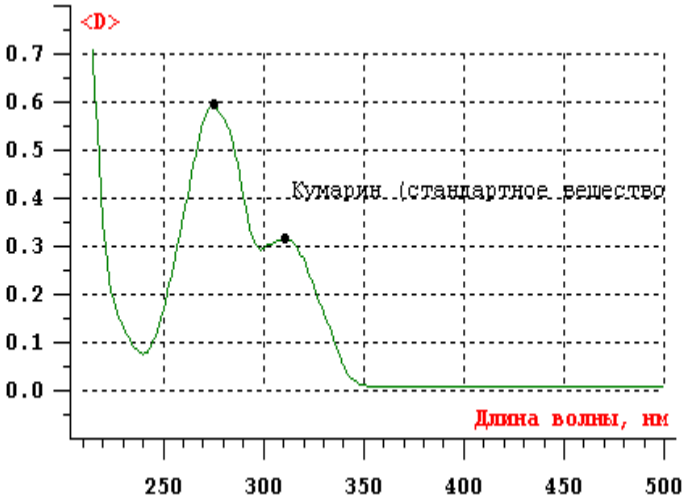


**Рисунок 3.13.** Электронный спектр поглощения ГСО кумарина в 96% спиртовом извлечении

Определение количественного содержания кумаринов проводили прямым спектрофотометрическим методом в суммарных извлечениях и в извлечениях, очищенных от сопутствующих веществ (рис. 3.12).

Для количественного определения содержания кумаринов был построен калибровочный график с использованием ГСО кумарина (рис. 3.14).

*Построение калибровочного графика.* Около 0,01 г (точная навеска) ГСО кумарина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и прибавляют 30 мл 96% спирта этилового, перемешивают до полного растворения (при необходимости нагревают на водяной бане, охлаждают), затем доводят объем раствора до метки 96% спиртом этиловым и перемешивают. Отбирают по 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 и 2,25 мл раствора в мерные колбы вместимостью 25 мл и доводят 96% спиртом этиловым до метки. Оптическую плотность растворов измеряют на спектрофотометре СФ-56 в кювете с толщиной слоя 10мм при длине волны 273 нм. В качестве раствора сравнения используют 96% спирт этиловый. Для построения калибровочного графика по оси ординат откладывают показания прибора - оптическую плотность растворов, а по оси абсцисс – концентрацию ГСО кумарина в мг в 1 мл раствора.

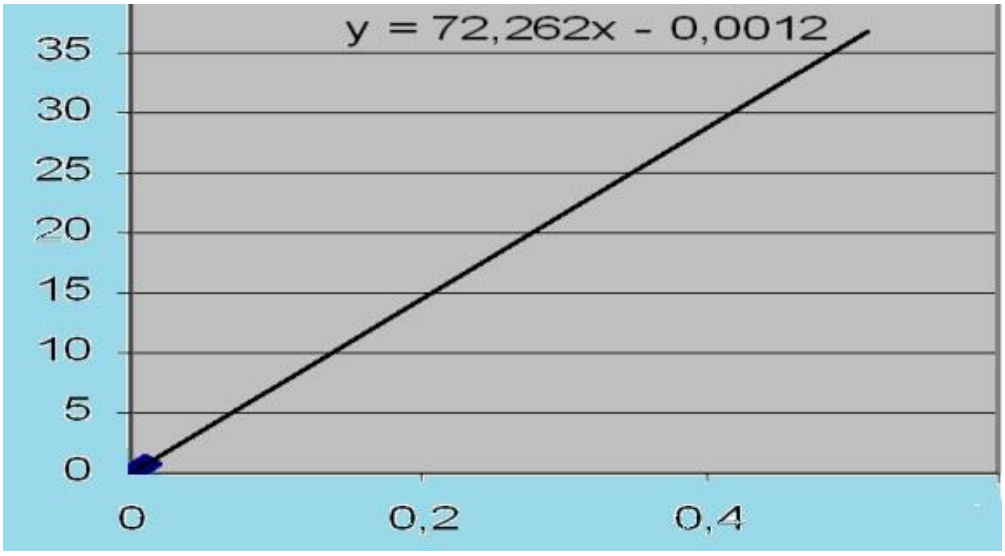



**Рисунок 3.14.** Калибровочный график, построенный по ГСО кумарина

При сравнительном анализе образцов бересты №№ 2 и 5 на содержание кумаринов в очищенных извлечениях установлено, что исследуемые образцы бересты *B.pubescens* (№5) и *B.pendula* (№2) не имеют существенных различий (табл. 3.6).

При анализе результатов, полученных при прямом методе определения содержания кумаринов в суммарных извлечениях, наблюдалась та же закономерность (табл. 3.6).

Анализ полученных результатов сравниваемых методик определения содержания кумаринов, свидетельствует в пользу предварительной очистки суммы кумаринов от сопутствующих веществ, имеющих поглощение в той же области спектра (табл. 3.6).

Таблица 3.6

**Содержание кумаринов в образцах бересты *B. pendula* и *B. pubescens***

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образцы бересты | Метод спектрофотометрии с предварительной очисткой суммы кумаринов от сопутствующих веществ | Прямая спектрофотометрия |
|---|---|---|
| | Содержание кумаринов (в пересчете на кумарин, в %) | |
| *B. pendula* (№2) | 0,23±0,01 | 0,69±0,03 |
| *B. pubescens* (№5) | 0,26±0,01 | 0,55±0,03 |

Таким образом, методами хроматографии в бересте установлено наличие 10 кумаринов, из которых выделен и идентифицирован кумарин. Видовая принадлежность и эколого-географический фактор не влияют на качественный состав кумаринов. Сравнительный анализ количественного содержания кумаринов в образцах бересты №№2 и 5 показал их близость.

## 3.4. Полифенольные окисляемые соединения (дубильные вещества) Анализ качественного состава и количественного содержания дубильных веществ

При проведении общего фитохимического анализа образцов бересты *B. pendula* и *B. pubescens* обнаружены полифенольные окисляемые (дубильные) вещества с преобладанием гидролизуемой группы. Нами проведен анализ содержания данной группы соединений в зависимости от вида березы, места произрастания растений и возраста бересты.

Для проведения сравнительного анализа содержания суммы полифенольных окисляемых веществ в исследуемых образцах бересты использовали следующую методику: около 1 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц 3 мм, помещали в коническую колбу, заливали последовательно 30 мл 96%, 70%, 40%, 20% спирта этилового и воды очищенной, колбу присоединяли к обратному холодильнику и выдерживали на водяной бане в течение 30 мин с момента закипания экстрагента. Полученные извлечения в горячем виде фильтровали через бумажный фильтр и замеряли точный объем извлечения.

Определение суммы полифенольных окисляемых веществ в пересчете на танин осуществляли в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 275 нм на приборе СФ-56. Раствор сравнения – 96%, 70%, 40%, 20% спирт этиловый и вода очищенная, соответственно (рис. 3.17, 3.18).

**Расчет содержания дубильных веществ в пересчете на танин осуществляли по формуле:**

$$X=D\times V\times 100\%/K\times m\times(100-W), \text{ где}$$

V – объем извлечения, полученного из сырья, мл;

K – коэффициент пропорциональности, рассчитанный по калибровочному графику, построенному по стандартному веществу – танину;

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

$$X_{ОБ.}= X_{96\%}+X_{70\%}+X_{40\%}+X_{20\%}+X_{H2O}, \text{ где}$$

$X_{ОБ.}$ - общее содержание дубильных веществ;

$X_{96\%}$ - содержание дубильных веществ в 96% спиртовом извлечении;

$X_{70\%}$ - содержание дубильных веществ в 70% спиртовом извлечении;

$X_{40\%}$ - содержание дубильных веществ в 40% спиртовом извлечении;

$X_{20\%}$ - содержание дубильных веществ в 20% спиртовом извлечении;

$X_{H2O}$ - содержание дубильных веществ в водном извлечении.

***Построение калибровочного графика.*** 40 мг (точная навеска) РСО танина, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 15 мл воды очищенной и перемешивают до растворения РСО танина (при необходимости слегка нагревают на водяной бане), затем доводят водой очищенной до метки. Отбирают по 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 и 2,25 мл раствора в мерные колбы вместимостью 25 мл и доводят водой очищенной до метки.

Оптическую плотность растворов измеряют на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 275 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм (рис. 3.15). В качестве раствора сравнения используют воду очищенную. Для построения калибровочного графика (рис. 3.16) по оси ординат откладывают оптическую плотность растворов, а по оси абсцисс – концентрацию РСО танина в мг в 1 мл раствора.

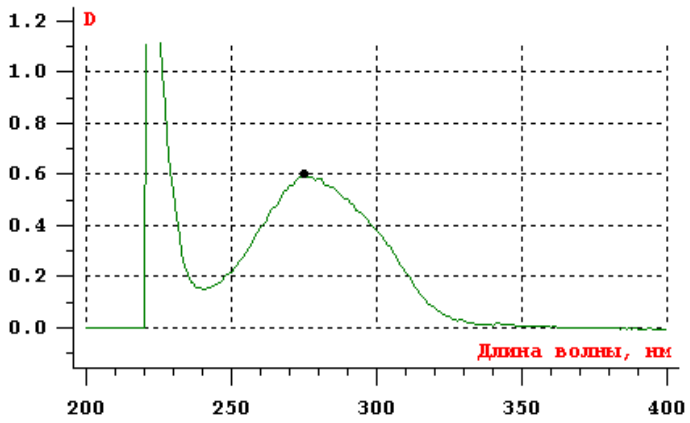



**Рисунок 3.15.** Электронный спектр поглощения РСО танина. Максимум поглощения при λ=275 нм

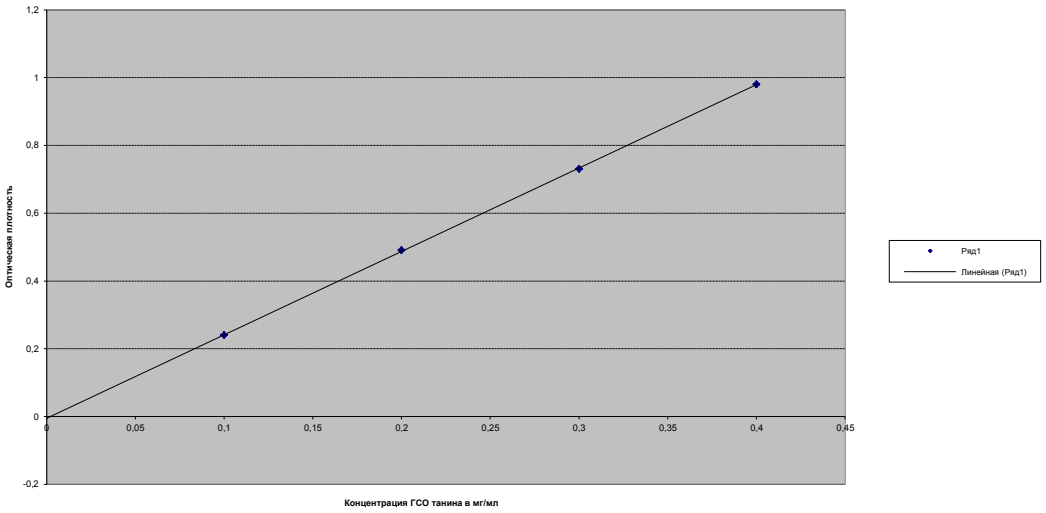



**Рисунок 3.16.** Калибровочный график РСО танина

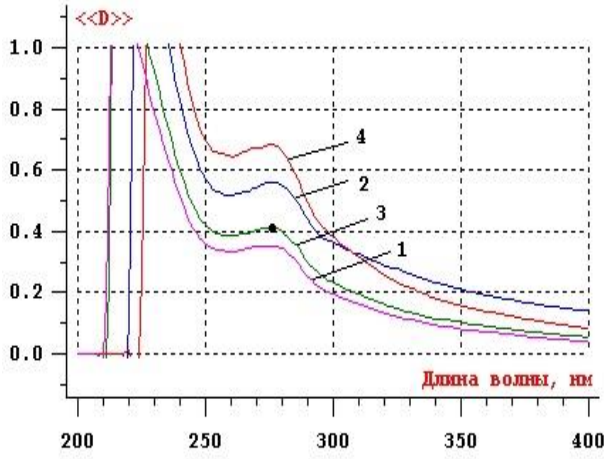



**Рисунок 3.17.** Электронный спектр поглощения извлечений из образцов бересты №№ 1, 2, 3, 4

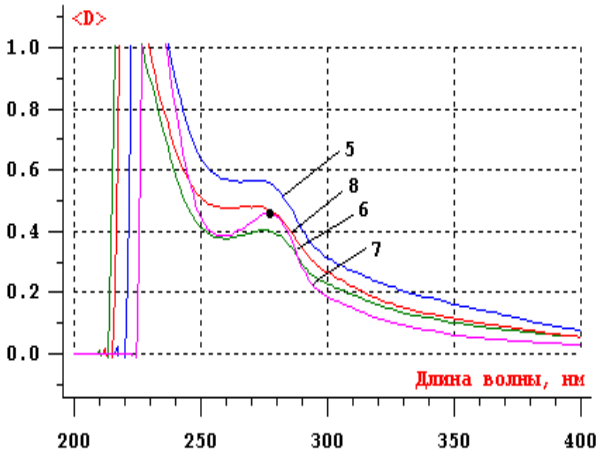



**Рисунок 3.18.** Электронный спектр поглощения извлечений из образцов бересты №№ 5, 6, 7, 8

По результатам сравнительного анализа исследуемых образцов бересты, по содержанию суммы полифенольных окисляемых соединений, их можно распределить на три группы: I группа – с наименьшим содержанием (около 2,0%) исследуемой группы веществ – образцы №№ 5,6,7; II группа объединяет образцы с наибольшим содержанием дубильных веществ (4,0%) - образцы №№ 4,8 и III группа занимает промежуточное положение – объединяет образцы с содержанием дубильных веществ около 3,0% - образцы №№ 2 и 3 (табл. 3.7). Содержание дубильных веществ в пределах одного промыслового района в образцах бересты березы повислой (№2) и березы пушистой (№5) отличается на 0,6%. Выявлено, что в зависимости от места произрастания содержание данной группы веществ находится в пределах от 2,8 до 4% для образцов бересты березы повислой и от 2 до 4,3% - березы пушистой.

Таблица 3.7

**Содержание дубильных веществ в образцах бересты**
***B. pendula* и *B. pubescens* в зависимости от места произрастания**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образцы* | 96% спиртовое извлечение | 70% спиртовое извлечение | 40% спиртовое извлечение | 20% спиртовое извлечение | Водное извлечение | Суммарное содержание дубильных веществ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,24±0,11 | 0,76±0,04 | 0,16±0,01 | 0,17±0,01 | 0,11±0,006 | 3,44±0,17 |
| 2 | 1,93±0,10 | 0,55±0,03 | 0,13±0,01 | 0,13±0,01 | 0,06±0,003 | 2,80±0,14 |
| 3 | 1,81±0,09 | 0,54±0,03 | 0,25±0,01 | 0,18±0,01 | 0,15±0,01 | 2,94±0,15 |
| 4 | 2,29±0,11 | 0,87±0,04 | 0,37±0,02 | 0,32±0,02 | 0,14±0.01 | 4,01±0,20 |
| 5 | 1,33±0,07 | 0,29±0,01 | 0,15±0,01 | 0,21±0,01 | 0,12±0,01 | 2,09±0,10 |
| 6 | 1,48±0,07 | 0,12±0,01 | 0,08±0,004 | 0,09±0,005 | 0,04±0,002 | 1,82±0,09 |
| 7 | 1,58±0,08 | 0,28±0,01 | 0,08±0,004 | 0,08±0,004 | 0,05±0,003 | 2,08±0,10 |
| 8 | 3,03±0,15 | 0,87±0,04 | 0,17±0,01 | 0,12±0,006 | 0,09±0,005 | 4,28±0,21 |

Обозначения*: 1 – береста *B. pendula,* березовый колок, Буготагские сопки (НСО); 2 - береста *B. pendula,* березовый лес, Колыванский район (НСО); 3 - береста *B. pendula,* березовый лес, Иркутская область; 4 - береста *B. pendula,* березовый колок, Венгеровский район (НСО); 5 – береста *B. pubescens,* Кудряшовский бор (НСО); 6 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Алтайский край; 7 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Костромская область; 8 - береста *B. pubescens,* опушка леса, Пермский край.

Проведен анализ зависимости содержания дубильных веществ в бересте от ее возраста. Установлено, что возраст бересты не оказывает существенного влияния на содержание суммы исследуемых веществ и составляет примерно 2,5% (табл. 3.8).

Талица 3.8

**Зависимость содержания дубильных веществ от возраста бересты**

(в % , в пересчете на абсолютно сухое сырье)

| Высота (м) | 96% спиртовое извлечение | 70% спиртовое извлечение | 40% спиртовое извлечение | 20% спиртовое извлечение | Водное извлечение | Содержание дубильных |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1,2 | 1,26±0,06 | 0,57±0,03 | 0,16±0,01 | 0,13±0,01 | 0,08±0,004 | 2,20±0,11 |
| 2 | 1,76±0,09 | 0,57±0,03 | 0,17±0,01 | 0,15±0,01 | 0,11±0,01 | 2,76±0,14 |
| 3,2 | 1,80±0,09 | 0,58±0,03 | 0,18±0,01 | 0,17±0,01 | 0,12±0,01 | 2,85±0,15 |
| 5,7 | 1,47±0,07 | 0,51±0,03 | 0,21±0,01 | 0,18±0,01 | 0,11±0,01 | 2,48±0,12 |
| 12 | 1,33±0,07 | 0,39±0,02 | 0,16±0,01 | 0,16±0,01 | 0,11±0,01 | 2,15±0,11 |
| 14 | 1,85±0,09 | 0,44±0,02 | 0,17±0,01 | 0,13±0,01 | 0,1±0,01 | 2,69±0,13 |

*Примечание:* высота (м) – расстояние от основания ствола дерева до участка на стволе, где были взяты образцы бересты для исследования.

Содержание полифенольных окисляемых соединений в водных извлечениях из бересты двух видов березы (образцы №№2 и 5) определяли двумя методами: титриметрическим (перманганатометрия) [41] (рис. 3.19, 3.20) и прямой спектрофотометрией (см. 2.8.4.2).

Выявлено, что показатель - содержание полифенольных окисляемых соединений в бересте не имеет существенных различий в зависимости от вида березы (табл. 3.9).

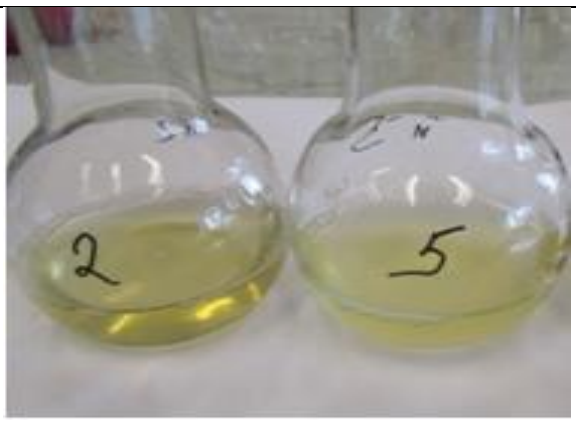
При сравнительном анализе результатов двух используемых методик установлено, что их значения близки (табл. 3.9).

Таблица 3.9

**Содержание дубильных веществ в водных извлечениях, полученных из образцов бересты *B. pendula* и *B. pubescens***

(в % , в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образцы | Метод | |
|---|---|---|
| | Титриметрический | Спектрофотометрический |
| Образец бересты *Betula pendula* (№2) | 0,76±0,04 | 0,82±0,04 |
| Образец бересты *Betula pubescens* (№5) | 0,69±0,03 | 0,71±0,04 |

| | |
|---|---|
|  |  |
| **Рисунок 3.19.** Фотография водных извлечений из образцов бересты №№2 и 5, оттитрованных 0,02 моль/л раствором калия перманганата | **Рисунок 3.20.** Фотография водных извлечений из образцов бересты №№2 и 5 с индикатором - индигосульфокислота |

Исследования по подбору лучшего экстрагента полифенольных окисляемых соединений из бересты двух видов березы (образцы №№ 2 и 5), проводились с использованием воды очищенной, спирта этилового 96% и водно-спиртовых смесей с содержанием этанола 20%, 40%, 70%, 80%. Выявлено, что спирт этиловый 80% извлекает из бересты наибольшее количество дубильных веществ (табл. 3.10).

Таблица 3.10

**Результаты определения влияния экстрагента на выход полифенольных окисляемых соединений из образцов бересты *B. pendula* и *B. pubescens***

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Экстрагент | Образцы | |
|---|---|---|
| | *B. pendula* (№2) | *B. pubescens* (№5) |
| | Содержание дубильных веществ ( в пересчете на танин, в %) | |
| Вода очищенная | 0,73±0,04 | 0,81±0,04 |
| 20% этанол | 1,17±0,06 | 1,17±0,06 |
| 40% этанол | 1,27±0,06 | 1,42±0,07 |
| 70% этанол | 2,63±0,13 | 1,88±0,09 |
| 80% этанол | 3,35±0,17 | 2,81±0,14 |
| 96% этанол | 2,51±0,13 | 2,56±0,13 |

Таким образом, на содержание дубильных веществ бересты существенное влияние оказывает вид березы и место произрастания. Установлена, что разновозрастная береста по содержанию данной группы веществ однородна. Определен оптимальный экстрагент для извлечения дубильных веществ из бересты – 80% спирт этиловый.

## 3.5. Гидроксикоричные кислоты

### Анализ компонентного состава гидроксикоричных кислот

Для анализа компонентного состава гидроксикоричных кислот бересты были получены суммарные извлечения с использованием спирта этилового 96% и 70% (п.2.8.2.), которые затем объединили, спирт удалили и водный остаток исследовали методом бумажной хроматографии. В результате хроматографического анализа суммарных извлечений, полученных из образцов бересты №№ 2 и 5 обнаружено 6 веществ, из которых была идентифицирована кислота хлорогеновая (рис. 3.21).

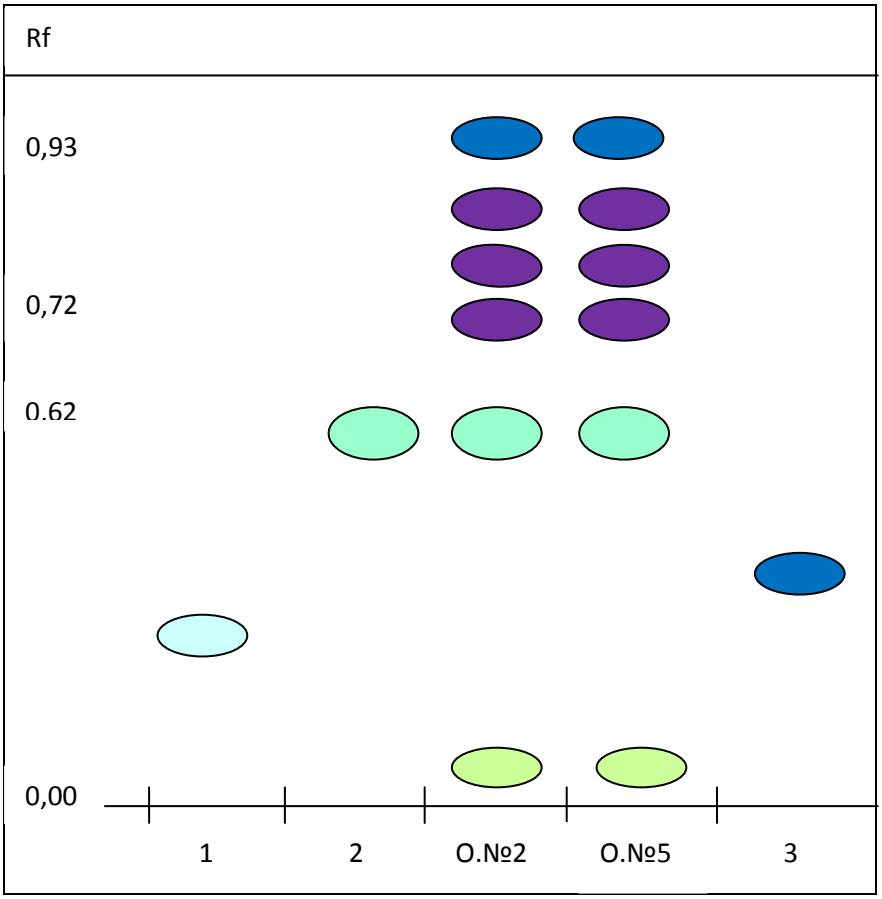



**Рисунок 3.21.** Схема хроматограммы при исследовании гидроксикоричных кислот бересты (образцов №№ 2 и 5) методом бумажной хроматографии

*Условия хроматографии:* бумага «Filtrak» FN3, система растворителей: 2% водный раствор кислоты уксусной.

*Обозначения:* О.№2 - береста *B. pendula*, березовый лес, Колыванский район (НСО); О.№5 - береста *B. pubescens*, Кудряшовский бор (НСО), СОВС 1 – кислота кофейная, 2 – кислота хлорогеновая, 3 – кислота феруловая

Сравнительный хроматографический анализ гидроксикоричных кислот исследуемых образцов бересты, собранных из разных точек ареала показал, что состав компонентов суммы гидрокискоричных кислот в образцах бересты березы повислой и березы пушистой (образцы №2 и №5) одинаков как в пределах одного района заготовки, так и по регионам России (табл. 3.11).

Таблица 3.11

**Результаты хроматографического исследования гидроксикоричных кислот в образцах бересты**

| Система | Вещество | Rf | Свечение в УФ - свете | | Окраска пятен после реакции азосочетания | Образцы* | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | До | После | | | | | | | | | |
| | | | обработки 5% спиртовым раствором NaOH | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| **2% уксусная кислота** | Не идентифицировано | 0,08 | желто-зеленое | желто-зеленое | розовое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Кислота хлорогеновая | 0,62 | синее | Зелено-голубое | оранжевое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,72 | фиолетовое | фиолетовое | розово-коричневое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,80 | синее | фиолетовое | оранжевое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,86 | фиолетовое | фиолетовое | розовое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,93 | синее | синее | оранжевое | + | + | + | + | + | + | + | + |

*Примечания.* Условия хроматографии: бумага «Filtrak» FN3, система растворителей: 2% водный раствор уксусной кислоты

Обозначения*: 1 – береста *B. pendula,* березовый колок, Буготагские сопки (НСО); 2 - береста *B. pendula,* березовый лес, Колыванский район (НСО); 3 - береста *B. pendula*, березовый лес, Иркутская область; 4 - береста *B. pendula*, березовый колок, Венгеровский район (НСО); 5 – береста *B. pubescens,* Кудряшовский бор (НСО); 6 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Алтайский край; 7 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Костромская область; 8 - береста *B. pubescens,* опушка леса, Пермский край.

Подтверждение наличия кислоты хлорогеновой проводили методом ВЭЖХ (п. 2.3.3). Ранее полученное суммарное извлечение для анализа гидроксикоричных кислот нанесли в 4-х кратной повторности на хроматографическую бумагу «Filtrak» FN3. Хроматограмму поместили в хроматографическую камеру, насыщенную системой: 2% раствор кислоты уксусной. После прохождения растворителя не менее 25 см хроматограмму вынули, высушили и просмотрели в УФ - свете. Одну из 4-х хроматограмм проявили хромогенными реактивами (пары аммиака, 5% раствор натрия гидроксида в 95% спирте этиловом). Отметили

границы пятен вещества с Rf=0,62. Отмеченные на трех хроматограммах пятна вещества (в трех повторностях) вырезали, измельчили и каждую повторность отдельно элюировали горячим 70% спиртом этиловым. Элюаты охлаждали до комнатной температуры и анализировали на хроматографе.

Анализ проводили в автоматическом режиме по заданной программе. Вещество идентифицировали по времени удерживания в сравнении со стандартным образцом – кислотой хлорогеновой. Анализируемое вещество идентифицировалось как кислота хлорогеновая ($t_R$ = 18,298) (рис. 3.22, 3.23).

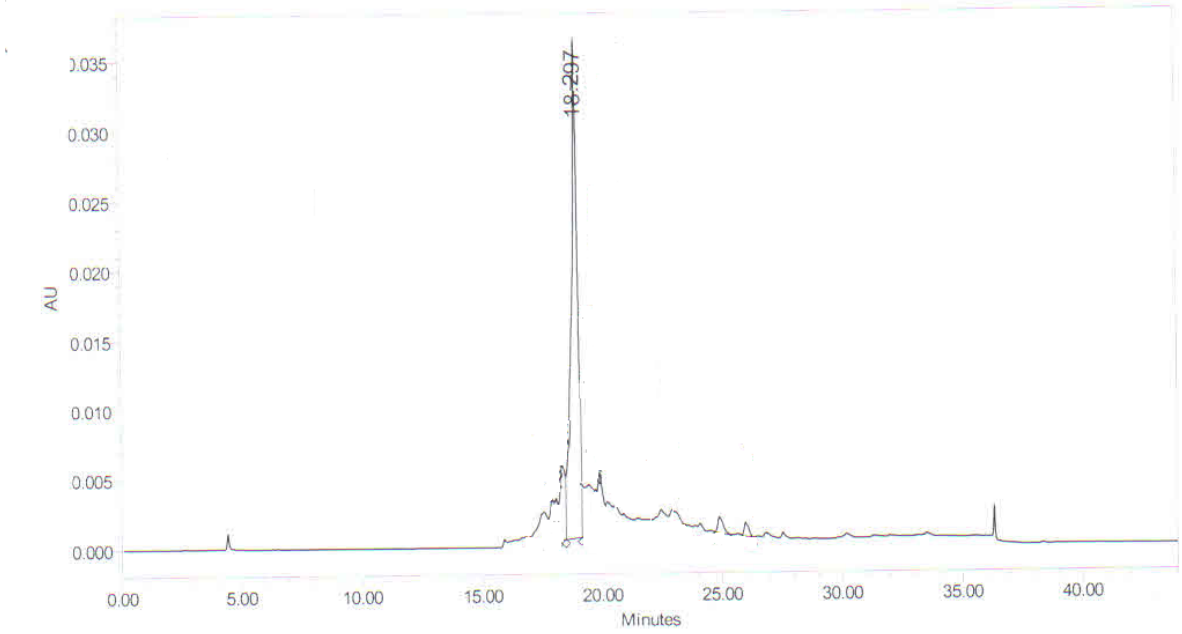



**Рисунок 3.22.** Хроматограмма элюата вещества с Rf=0,62 ($t_R$ = 18,297)

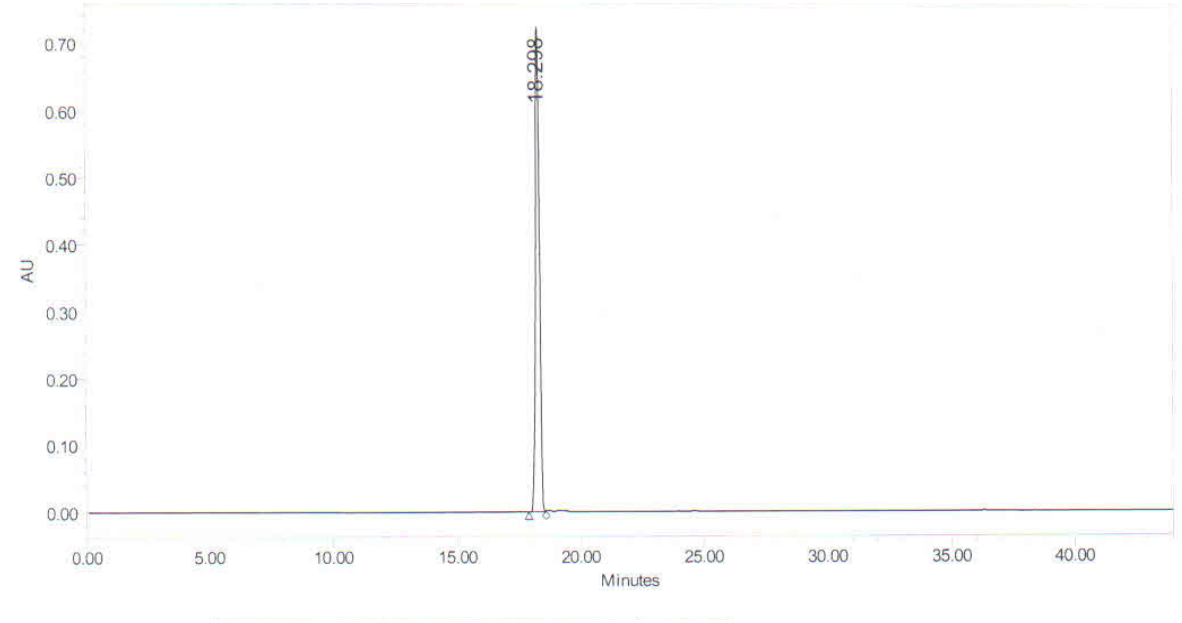



**Рисунок 3.23.** Хроматограмма стандартного вещества – кислоты хлорогеновой

На основании проведенных исследований, установлено, что все исследуемые образцы бересты содержат кислоту хлорогеновую, которая является доминирующим компонентом в сумме гидроксикоричных кислот. Данный факт подтверждается визуальной оценкой хроматограмм в УФ - свете - наибольшей площадью пятна и наибольшей интенсивностью свечения вещества, идентифицированного как кислота хлорогеновая и данными ВЭЖХ. Поэтому при анализе количественного содержания суммы гидроксикоричных кислот в суммарных извлечениях расчет содержания проводили в пересчете на кислоту хлорогеновую.

***Построение калибровочного графика.*** 40 мг (точная навеска) ГСО кислоты хлорогеновой, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл 70% спирта этилового и перемешивают до растворения кислоты хлорогеновой, затем доводят 70%-ным этанолом до метки. Отбирают по 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 и 2,25 мл раствора в мерные колбы вместимостью 25 мл и доводят 70%-ным спиртом этиловым до метки.

Оптическую плотность растворов измеряют на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 326 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 70%-ный спирт этиловый. Для построения калибровочного графика по оси ординат откладывают оптическую плотность, а по оси абсцисс – концентрацию РСО кислоты хлорогеновой в мг в 1 мл раствора (рис. 3.24).

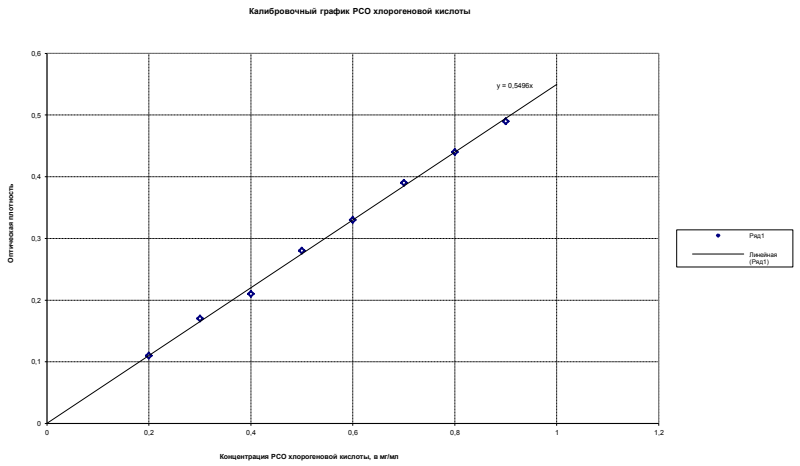



**Рисунок 3.24.** Калибровочный график ГСО кислоты хлорогеновой

Сравнительный анализ данных по содержанию гидроксикоричных кислот в образцах бересты березы повислой и березы пушистой, собранных из различных точек ареала выявил, что образцы №№ 3, 6 и 7 содержат данную группу веществ менее 1,0%, образцы №№ 2 и 4 – немногим более 1,0%, а образцы №№ 1 и 5 накапливают до 1,5%, наибольшее содержание отмечено у образца № 8 (табл. 3.12).

Таблица 3.12

**Содержание гидроксикоричных кислот в образцах бересты *B. pendula* и *B. pubescens* в зависимости от места произрастания**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образцы * | 96% спиртовое извлечение | 70% спиртовое извлечение | Суммарное содержание гидроксикоричных кислот |
|---|---|---|---|
| 1 | 1,17±0,06 | 0,25±0,01 | 1,43±0,07 |
| 2 | 0,94±0,05 | 0,21±0,01 | 1,14±0,06 |
| 3 | 0,67±0,03 | 0,22±0,008 | 0,89±0,04 |
| 4 | 0,94±0,05 | 0,21±0,01 | 1,14±0,06 |
| 5 | 1,28±0,06 | 0,14±0,01 | 1,42±0,07 |
| 6 | 0,94±0,05 | 0,05±0,003 | 0,99±0,05 |
| 7 | 0,83±0,04 | 0,11±0,006 | 0,94±0,05 |
| 8 | 1,54±0,08 | 0,34±0,02 | 1,88±0,09 |

Обозначения*: 1 – береста *B. pendula,* березовый колок, Буготагские сопки (НСО); 2 - береста *B. pendula,* березовый лес, Колыванский район (НСО); 3 - береста *B. pendula*, березовый лес, Иркутская область; 4 - береста *B. pendula*, березовый колок, Венгеровский район (НСО); 5 – береста *B. pubescens,* Кудряшовский бор (НСО); 6 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Алтайский край; 7 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Костромская область; 8 - береста *B. pubescens,* опушка леса, Пермский край.

Исследование влияния возраста бересты на накопление данной группы веществ, показало, что содержание гидроксикоричных кислот в бересте приблизительно одинаковое по всей высоте ствола, за исключением комлевой части ствола (1,2 м), где имеет наименьшее значение - 0,82% (табл. 3.13).

Таблица 3.13

**Динамика содержания гидроксикоричных кислот в бересте в зависимости от ее возраста**

(в % , в пересчете на абсолютно сухое сырье)

| Высота (м) | 96% спиртовое извлечение | 70% спиртовое извлечение | Содержание гидроксикоричных кислот |
|---|---|---|---|
| 1,2 | 0,63±0,03 | 0,19±0,01 | 0,82±0,04 |
| 2 | 0,98±0,05 | 0,22±0,01 | 1,20±0,06 |
| 3,2 | 1,01±0,05 | 0,22±0,01 | 1,23±0,06 |
| 5,7 | 0,89±0,04 | 0,21±0,01 | 1,10±0,06 |
| 12 | 0,83±0,04 | 0,16±0,01 | 0,99±0,05 |
| 14 | 0,87±0,04 | 0,15±0,01 | 1,02±0,05 |

*Примечание:* высота (м) – расстояние от основания ствола дерева до участка на стволе, где были взяты образцы бересты для исследований.

Дальнейшим этапом исследования был подбор экстрагента, максимально извлекающего гидроксикоричные кислоты из бересты.

Были получены извлечения из образцов бересты (№№2 и 5) с использованием экстрагентов – спирта этилового 96%, водно-спиртовых смесей с содержанием спирта этилового 80%, 70%, 40%, 20% и воды очищенной. Установлено, что максимальный выход гидроксикоричных кислот наблюдался при использовании 80% спирта этилового - 1,28% (№2) и 1,74% (№5) (табл. 3.14).

Таблица 3.14

**Результаты определения влияния экстрагента на выход гидроксикоричных кислот из образцов бересты *B. pendula* и *B. pubescens***

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Экстрагент | Образец | |
|---|---|---|
| | *B. pendula* (№2) | *B. pubescens* (№5) |
| | Содержание гидроксикоричных кислот ( в пересчете на хлорогеновую кислоту, в %) | |
| Вода очищенная | 0,13±0,01 | 0,18±0,01 |
| 20% этанол | 0,17±0,01 | 0,25±0,01 |
| 40% этанол | 0,17±0,01 | 0,31±0,02 |
| 70% этанол | 0,99±0,05 | 1,01±0,05 |
| 80% этанол | 1,28±0,06 | 1,74±0,09 |
| 96% этанол | 1,09±0,05 | 1,71±0,09 |

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что все образцы бересты существенных различий в компонентном составе суммы гидроксикоричных кислот не имеют, доминирующей является кислота хлорогеновая.

Сравнительный анализ количественного содержания гидроксикоричных кислот выявил, что образцы бересты, взятые с исследуемых видов березы в пределах одного промыслового района имеют различные значения данного показателя: образец бересты березы повислой накапливает до 1,14%, а березы пушистой – 1,42%. Содержание гидроксикоричных кислот в зависимости от места произрастания находится в пределах от 0,89 до 1,88%. Возраст бересты не оказывает существенного влияния на накопление гидроксикоричных кислот, за исключением комлевой части дерева, где содержание составляет наименьшее значение – 0,82%. Оптимальным экстрагентом для извлечения данной группы веществ является 80% спирт этиловый.

## 3.6. Аминокислоты

### Анализ качественного состава аминокислот

Хроматографический анализ суммарных извлечений, полученных из образцов бересты №№ 2 и 5 показал наличие 14 аминокислот, из которых были идентифицированы 12, среди них - незаменимые аминокислоты (метионин, треонин, фенилаланин, триптофан, лизин) и аминокислоты, которые синтезируются в организме человека (орнитин, аланин, серин, пролин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, глутамин) (табл. 3.15, рис. 3.25 (см. в прил.).

Таблица 3.15

**Результаты хроматографического анализа состава аминокислот в образцах бересты *B. pendula* и *B. pubescens***

| № | Rf | Вещество | Обработка 0,2% спиртовым раствором нингидрина | Б. березы повислой | | | | Б. березы пушистой | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | № 1 | № 2 | № 3 | № 4 | № 5 | № 6 | № 7 | № 8 |
| 1 | 0,02 | Орнитин | розово-фиолетовое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 2 | 0,05 | Пролин | желтое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 3 | 0,07 | Лизин | фиолетовое | + | + | + | - | + | - | - | - |
| 4 | 0,1 | Серин | сиреневое | + | - | + | + | - | - | + | - |
| 5 | 0,12 | Не идентифицировано | розовое | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 6 | 0,14 | Аспарагиновая кислота | розовое | + | + | - | - | + | + | - | - |
| 7 | 0,18 | Глутамин | фиолетовое | + | - | - | + | - | - | + | - |
| 8 | 0,22 | Глутаминовая кислота | сиреневое | + | + | + | + | + | - | + | + |
| 9 | 0,27 | Треонин | фиолетовое | + | + | + | - | + | + | - | - |
| 10 | 0,33 | Аланин | фиолетовое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 11 | 0,37 | Не идентифицировано | розовое | + | - | - | + | - | + | - | + |
| 12 | 0,42 | Триптофан | розовое | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 13 | 0,54 | Метионин | розово-фиолетовое | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 14 | 0,62 | Фенилаланин | розовое | + | - | - | + | - | - | - | - |
| Общее количество веществ | | | | 12 вещ-в | 8 вещ-в | 8 вещ-в | 10 вещ-в | 8 вещ-в | 8 вещ-в | 7 вещ-в | 6 вещ-в |

Обозначения*: 1 – береста *B. pendula,* березовый колок, Буготагские сопки (НСО); 2 - береста *B. pendula,* березовый лес, Колыванский район (НСО); 3 - береста *B. pendula*, березовый лес, Иркутская область; 4 - береста *B. pendula*, березовый колок, Венгеровский район (НСО); 5 – береста *B. pubescens,* Кудряшовский бор (НСО); 6 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Алтайский край; 7 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Костромская область; 8 - береста *B. pubescens,* опушка леса, Пермский край.

Сравнительный хроматографический анализ аминокислот исследуемых образцов бересты, собранных из разных точек ареала показал, что состав компонентов суммы аминокислот в образцах бересты березы повислой и березы пушистой (образцы №№ 2 и 5) одинаков в пределах одного района заготовки и различается по регионам России.

На основании проведенных исследований аминокислотного состава видно, что во всех образцах бересты содержатся орнитин, пролин, аланин и триптофан (табл. 3.15). Доминирующим компонентом в сумме аминокислот является аланин. Данный факт подтверждается результатами сравнительного хроматографического исследования аминокислот и совпадением рисунка спектров поглощения продуктов взаимодействия суммы аминокислот, содержащихся в извлечениях, полученных из исследуемых образцов бересты и индивидуальной аминокислоты – аланина с 0,2% спиртовым раствором нингидрина (рис. 3.26, 3.27). Поэтому при анализе количественного содержания суммы аминокислот в извлечениях расчет количественного содержания проводили в пересчете на аланин.

Дальнейшим этапом исследования был подбор экстрагента, максимально извлекающего аминокислоты из бересты.

Проведено исследование содержания аминокислот в извлечениях, полученных с использованием различных экстрагентов (вода очищенная и водно-этанольные смеси с содержанием спирта этилового 20%, 40%, 70%, 96%) (табл. 3.16).

Таблица 3.16

**Содержание аминокислот в извлечениях, полученных из бересты березы пушистой (образец № 5) с использованием различных экстрагентов**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Экстрагент | Сумма аминокислот (в пересчете на аланин) |
|---|---|
| Вода очищенная | 2,74±0,14 |
| 20% спирт этиловый | 1,83±0,09 |
| 40% спирт этиловый | 1,63±0,08 |
| 70% спирт этиловый | 2,10±0,11 |
| 96% спирт этиловый | 1,85±0,09 |

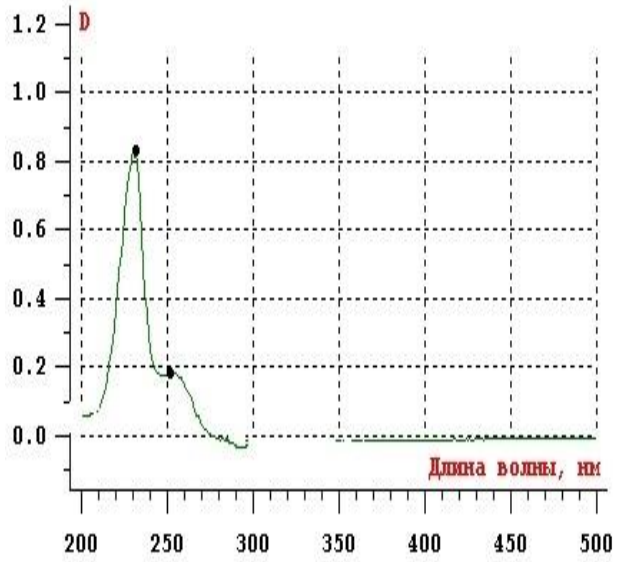



**Рисунок 3.26**. Электронный спектр поглощения продуктов взаимодействия ГСО аланина с 0,2% спиртовым раствором нингидрина

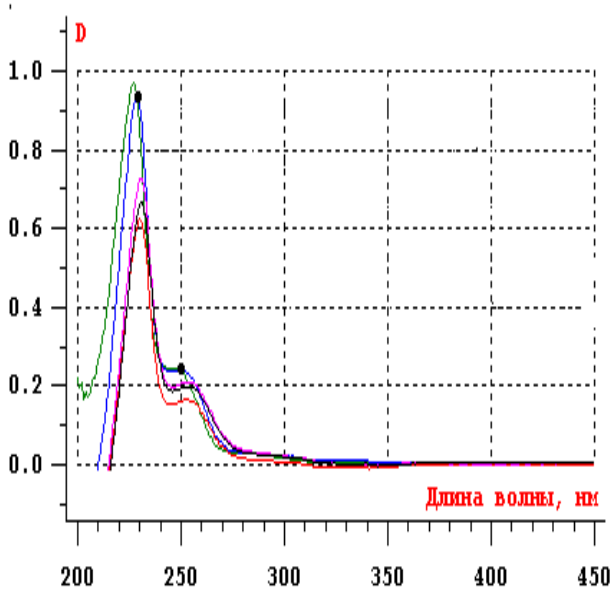



**Рисунок 3.27**. Электронные спектры поглощения продуктов взаимодействия суммы аминокислот с 0,2% спиртовым (водным) раствором нингидрина (водное, 20,40,70,96% спиртовые извлечения образца бересты №5)

Исследование содержание суммы аминокислот в извлечениях из бересты, полученных с использованием воды очищенной, спирта этилового 96% и водно-спиртовых смесей с содержанием этанола 20%, 40%, 70%, показало, что вода очищенная извлекает из бересты наибольшее количество аминокислот.

Для проведения сравнительного анализа содержания суммы аминокислот в исследуемых образцах бересты, образцы сырья последовательно экстрагировали 96% спиртом этиловым, затем водно-спиртовыми смесями с содержанием спирта этилового 70%, 40%, 20% и завершили экстракцию водой очищенной. В полученных суммарных извлечениях определяли содержание аминокислот.

Установлено, что содержание аминокислот в образцах №№2, 3, 4, 5, 6, 7 и №№1, 8 приблизительно одинаковое. Наибольшее содержание аминокислот наблюдается в образцах №№1 и 8 (табл. 3.17).

Таблица 3.17

**Содержание суммы аминокислот в суммарных извлечениях, полученных последовательной экстракцией образцов бересты березы повислой и березы пушистой**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образцы * | №1 | №2 | №3 | №4 | №5 | №6 | №7 | №8 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Сумма аминокислот ( в пересчете на | 3,50 ±0,18 | 2,56 ±0,13 | 2,69 ±0,13 | 2,06 ±0,1 | 2,67 ±0,13 | 2,80 ±0,14 | 2,34 ±0,12 | 3,75 ±0,19 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| аланин) | | | | | | | | |

Обозначения*: 1 – береста *B. pendula,* березовый колок, Буготагские сопки (НСО); 2 – береста *B. pendula,* березовый лес, Колыванский район (НСО); 3 – береста *B. pendula*, березовый лес, Иркутская область; 4 – береста *B. pendula*, березовый колок, Венгеровский район (НСО); 5 – береста *B. pubescens,* Кудряшовский бор (НСО); 6 – береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Алтайский край; 7 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Костромская область; 8 - береста *B. pubescens,* опушка леса, Пермский край.

Известно, что возраст березы может достигать более 100 лет. Возникает вопрос – влияет ли возраст растения на содержание аминокислот в бересте. Для проведения данного исследования были собраны образцы бересты со ствола одного растения на разной высоте. Анализ показал, что возраст бересты не оказывает существенного влияния на содержание суммы исследуемых веществ (табл. 3.18).

Таблица 3.18

**Содержание суммы аминокислот в образцах бересты березы повислой в зависимости от локализации на стволе (от возраста бересты)**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образец №№ | Высота от основания ствола (м) | Сумма аминокислот (в пересчете на аланин) |
|---|---|---|
| 9 | 1,2 | 2,66±013 |
| 10 | 2 | 2,42±0,12 |
| 11 | 3,2 | 2,72±0,14 |
| 12 | 5,7 | 2,83±0,14 |
| 13 | 12 | 2,97±0,15 |
| 14 | 14 | 2,51±0,13 |

*Примечание:* высота (м) – расстояние от основания ствола дерева до участка на стволе, где были взяты образцы бересты для исследований.

Таким образом, в образцах бересты березы повислой и березы пушистой обнаружено 14 аминокислот, из которых были идентифицировано 12, среди них незаменимые аминокислоты: метионин, треонин, фенилаланин, триптофан, лизин и аминокислоты, которые синтезируются в печени человека: орнитин, аланин, серин, пролин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, глутамин. Состав компонентов аминокислот в образцах бересты березы повислой и березы пушистой одинаков в пределах одного района заготовки и различается по регионам России. Установлено, что оптимальным экстрагентом для извлечения суммы аминокислот из бересты является вода очищенная. Содержание аминокислот в образцах бересты березы повислой и березы пушистой в зависимости от места произрастания находится в пределах от 2,0 до 3,5%. Установлено, что береста на всей поверхности ствола березы повислой по содержанию аминокислот однородна.

## Выводы по главе 3

1. Общий фитохимический анализ образцов бересты *B. pendula* и *B. pubescens* показал наличие первичных (аминокислоты, полисахариды) и вторичных метаболитов (тритерпеновые сапонины, полифенольные окисляемые соединения (дубильные вещества преимущественно гидролизуемой группы), флавоноиды, кумарины, гидроксикоричные кислоты, полисахариды и аминокислоты)
2. Образцы бересты, собранные из различных точек ареала произрастания березы повислой и березы пушистой по составу основных групп БАВ существенных различий не имеют.
3. Установлено, что компонентный состав основных групп БАВ (тритерпеновые сапонины, дубильные вещества, кумарины, гидроксикоричные кислоты) одинаков у бересты березы повислой и березы пушистой независимо от места произрастания, за исключением аминокислот.
4. Выявлено, что береста на всей поверхности ствола березы повислой по содержанию тритерпеновых сапонинов, дубильных веществ, гидроксикоричных кислот, аминокислот однородна (за исключением комлевой части ствола).
5. В пределах одного промыслового района береза пушистая превосходит березу повислую по содержанию в бересте отдельных групп БАВ - тритерпеновых сапонинов и гидроксикоричных кислот; по содержанию аминокислот, кумаринов и дубильных веществ существенных различий не обнаружено.
6. Место произрастания влияет на содержание всех перечисленных групп БАВ бересты, наибольшие значения по всем группам БАВ имеет образец бересты №8 (Пермский край).

Таким образом, полученные результаты позволяют судить о том, что береста является источником не только тритерпеновых сапонинов, но и других групп БАВ, обладающих ценными фармакологическими эффектами.

# ГЛАВА 4
# УСТАНОВЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОДЛИННОСТИ И КАЧЕСТВА БЕРЕСТЫ *BETULA PENDULA* И *BETULA PUBESCENS*

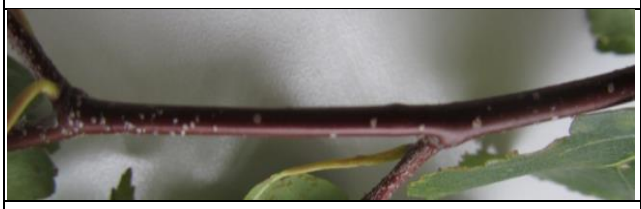
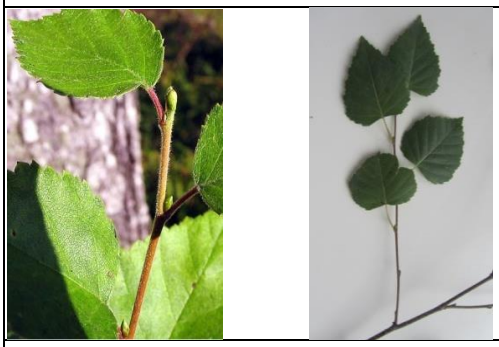
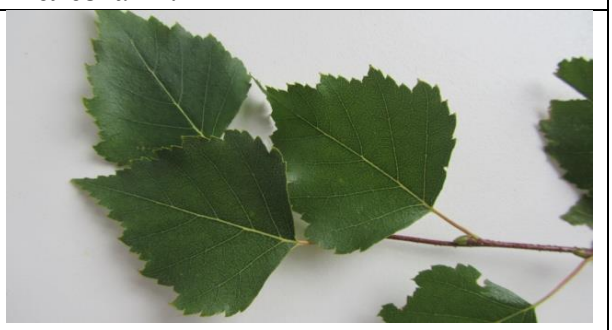
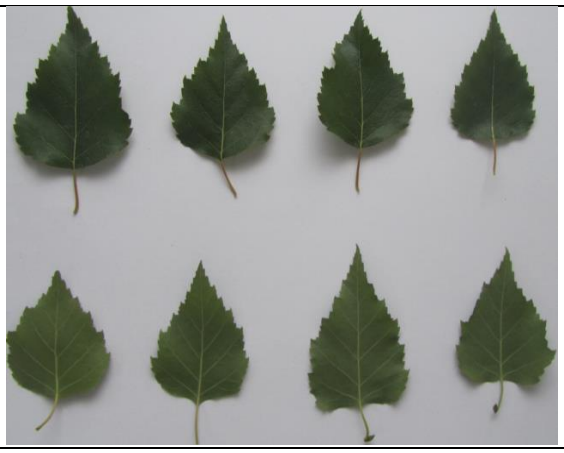
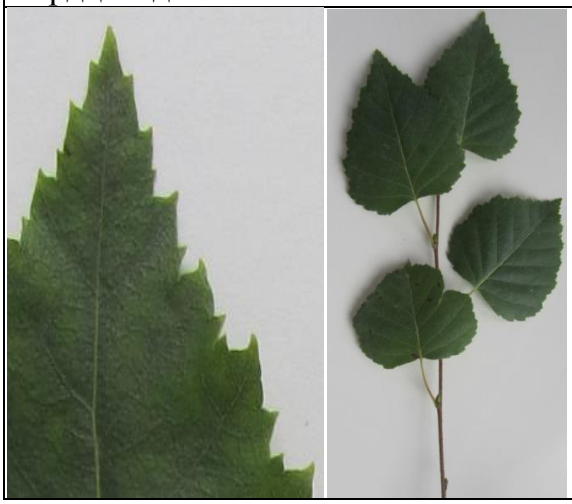
Для разработки фармакопейной статьи на сырье «Береста» необходимо установить показатели подлинности и числовые показатели с целью стандартизации и определения его доброкачественности.

## 4.1. Установление показателей подлинности

### 4.1.1. Габитус и внешние морфологические признаки *B. pendula* и *B. pubescens*

По внешним признакам *B. pendula* и *B. pubescens* имеют различия, основные из которых отображены на приведенных фотографиях (рис. 4.1.) и описаны в таблице 4.1.

| | |
|---|---|
|  |  |
| ***Betula pubescens* Ehrh. (**Береза пушистая) Ветви короткие, направленные вверх и в стороны. | ***Betula pendula* Roth. (**Береза повислая) Ветви длинные, повислые. |
|  |  |
| Кора гладкая, белая с поперечными штрихами. Ствол до самого основания белый. | Кора грязно-белая, с глубокими поперечными штрихами, легко расслаивающаяся, при основании ствола – черная, с глубокими |

| | |
|---|---|
| | трещинами (у взрослых растений). |
|  |  |
| Молодые побеги красно-бурые, без клейких железок | Молодые побеги красно-бурые, густо покрыты пахучими смолистыми железками. |
|  |  |
| Опушенность молодых побегов и нижней стороны листовой пластинки, без железок.<br>Листья очередные, длинночерешковые. | Листья очередные, длинночерешковые без заметного, невооруженным взглядом, опушения. |
|  |  |
| Овально-яйцевидные, более кожистые листья, большей частью, с сердцевидным основанием | Листья треугольно- или ромбически-яйцевидные, с широким клиновидным основанием |
|  |  |

| Листья по краям двоякоостропильчатые | Листья по краям двоякоострозубчатые |
|---|---|
|  |  |
| Береста чисто белая (с наружной стороны) | Береста снаружи серовато-белая, расслаивающаяся с глубокими черными поперечными штрихами |

**Рисунок 4.1.** Габитус и внешние морфологические признаки березы повислой и березы пушистой

Таблица 4.1

**Отличительные морфологические признаки *B. pubescens* и *B. pendula***

| Анализируемый орган | ***B. pubescens*** | ***B. pendula*** |
|---|---|---|
| **Ствол** | Кора гладкая, белая с поперечными штрихами. Ствол до самого основания белый. | Кора грязно-белая, с глубокими поперечными штрихами, легко расслаивающаяся, при основании ствола (в комлевой части) – черная, с глубокими трещинами (у взрослых растений). |
| **Молодые ветви** | Молодые побеги красно-бурые, без клейких железок. Опушенность молодых побегов и нижней стороны листовой пластинки. | Молодые побеги красно-бурые, густо покрыты пахучими смолистыми железками. |
| **Листья** | Овально-яйцевидные, более кожистые, большей частью с сердцевидным основанием | Треугольно- или ромбически-яйцевидные, с широким клиновидным основанием |
| **Край листа** | Двоякоостропильчатые | Двоякоострозубчатые |
| **Береста** | Береста чисто белая (с наружной стороны) | Береста снаружи серовато-белая, расслаивающаяся с глубокими черными поперечными штрихами |

### *4.1.2.* Микродиагностические признаки листа *B. pendula* и *B. pubescens*

### Микроскопический анализ листа *B. pendula*

Верхняя эпидерма листа представлена клетками, форма которых близка к изодиаметричной, боковые стенки эпидермальных клеток почти прямостенные (рис.4.2.1). Над жилками клетки эпидермы вытянутой формы (рис. 4.2.2). При анализе препарата листа с использованием люминесцентного микроскопа было обнаружено, что клетки верхней эпидермы не однородны – большая часть из них имеет выпуклую наружную стенку, меньшая часть – вогнутую (рис. 4.2.3). На верхней стороне листа устьиц не обнаружено; редко встречаются железки, большей частью по жилкам (рис.4.2.4, 4.2.6).

Железки имеют сложное строение, в них наблюдается большое количество секреторных клеток, окруженных кутикулярным колпаком (рис.4.2.5, 4.2.6). Место прикрепления железок находится ниже уровня эпидермы, т.е. железки погруженные (рис. 4.2.6).

Эпидерма нижней стороны листа слабо извилистостенная, выполнена также почти изодиаметричными клетками (рис.2.4.7). Над жилками эпидермальные клетки также вытянутые. На нижней стороне листа большое количество устьиц и железок (рис.4.2.8,). Устьица аномоцитного типа, погруженные (рис.4.2.7, 4.2.8).

Кончик листа заостренный. На кончике листа, по краю листовой пластинки и по жилкам встречаются многочисленные трихомы, которые представлены простыми и железистыми одноклеточными волосками (рис. 4.2.9 - 4.2.16). Железистые волоски с коричневым содержимым (рис.4.2.13, 4.2.16). Размеры волосков и толщина их стенок сильно варьирует: встречаются тонкостенные и толстостенные короткие и очень длинные, тонкие и толстые (рис. 4.2.12 - 4.2.15). Особенно много волосков наблюдается по жилкам у основания листа (4.2.12 - 4.2.16).

В паренхиме листа большое количество кристаллических включений – друзы и призматические кристаллы различных размеров, большей частью локализуются вдоль жилок (рис. 4.2.17).

Обнаруженные при микроскопическом анализе диагностические признаки (простые одноклеточные волоски, железистые волоски, друзы оксалата кальция, устьица аномоцитного типа, бурые железки в форме гриба) листа березы повислой сходны с микроскопическими признаками почек березы [171.1].

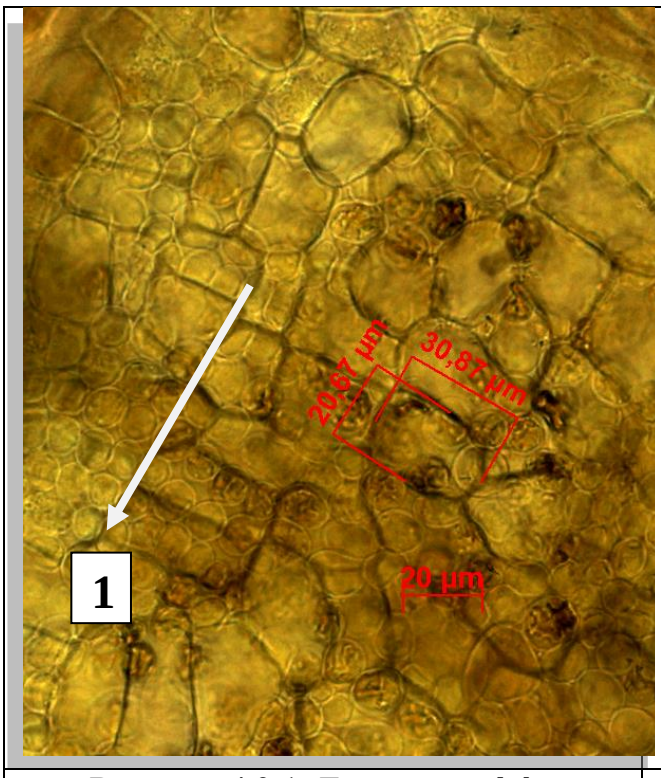



**Рисунок 4.2.1.** Лист *B. pendula.* Эпидерма верхней стороны листа. Ув. х 40.
1 – клетки эпидермиса.

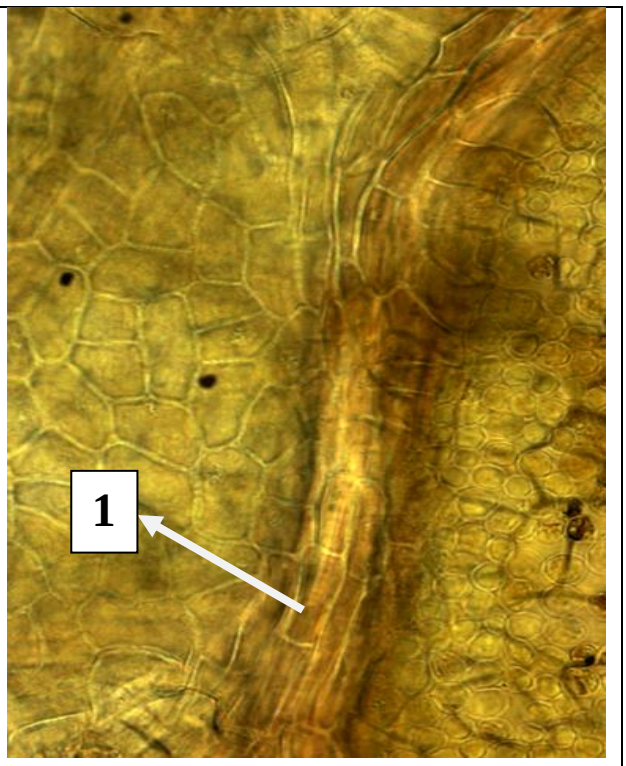



**Рисунок 4.2.2.** Лист *B. pendula.* Эпидерма над жилками на верхней стороне листа. Ув. х 40.
1 – клетки эпидермиса над жилкой верхней стороны листа.

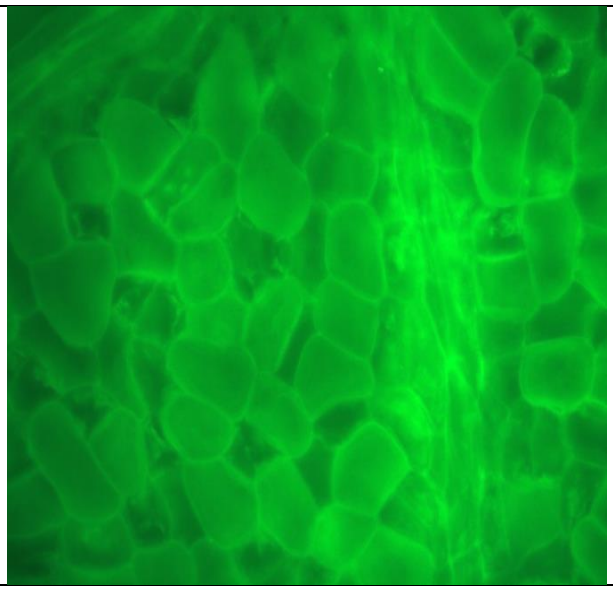
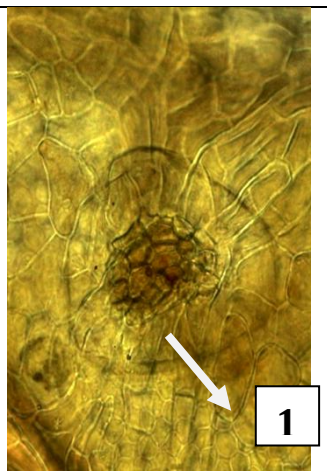


**Рисунок 4.2.3.** Лист *B. pendula.* Эпидерма верхней стороны листа (при рассмотрении в люминесцентный микроскоп). Ув. х 40.



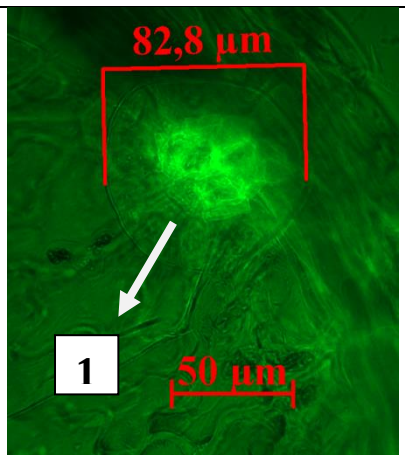




**Рисунок 4.2.4.** Лист *B. pendula.* Железка (локализация на жилке). Ув. х 40.
1 – железка на жилке листа.

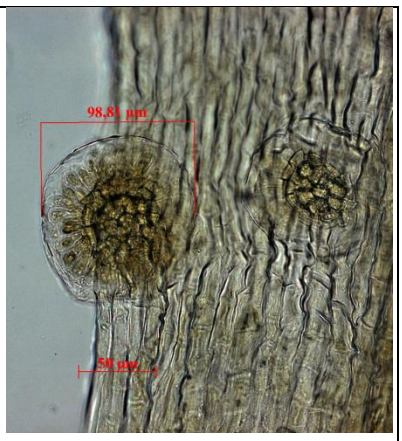
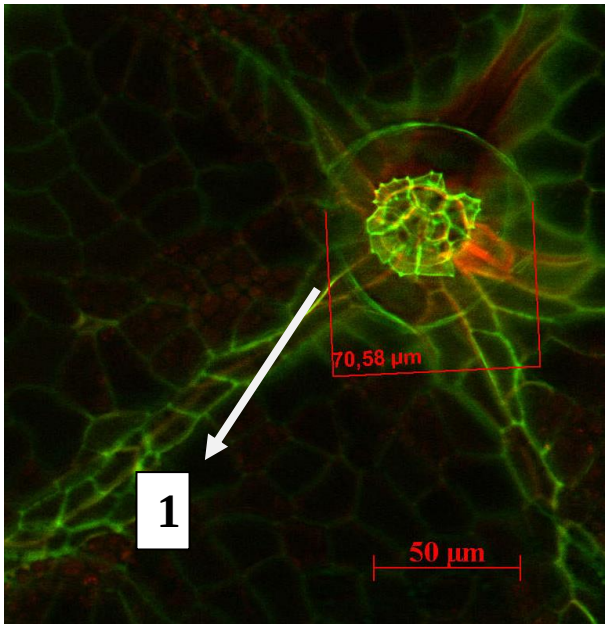


**Рисунок 4.2.5.** Лист *B. pendula.* Железки. Ув. х 40.



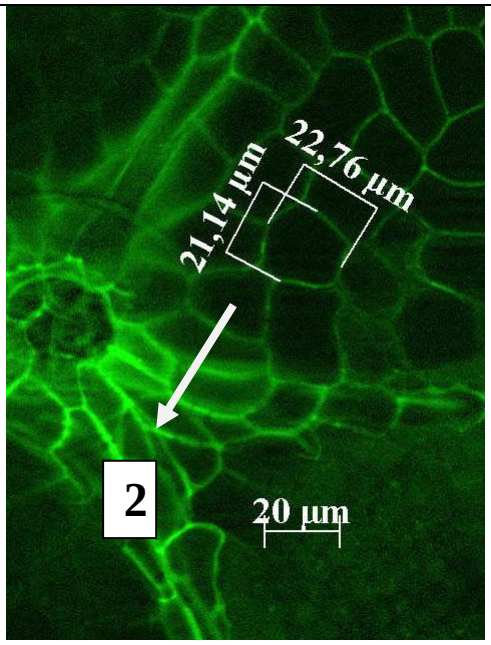
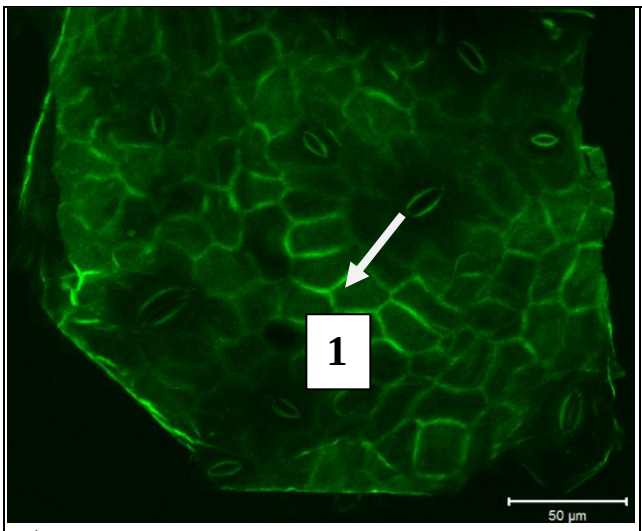
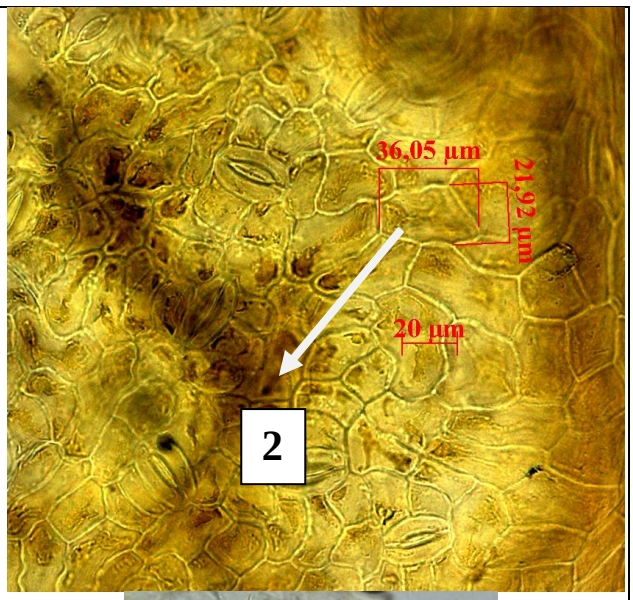
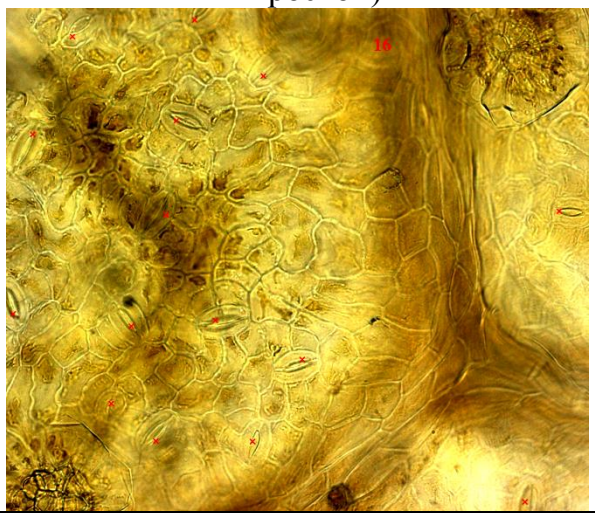




**Рисунок 4.2.6.** Лист *B. pendula.* Верхняя эпидерма листа, железки погруженные (при рассмотрении в люминесцентный микроскоп). Ув. х 40.
1 – железка на жилке верхней стороны листа.
2 – клетки эпидермиса верхней стороны листа.




(при рассмотрении в люминесцентный микроскоп)



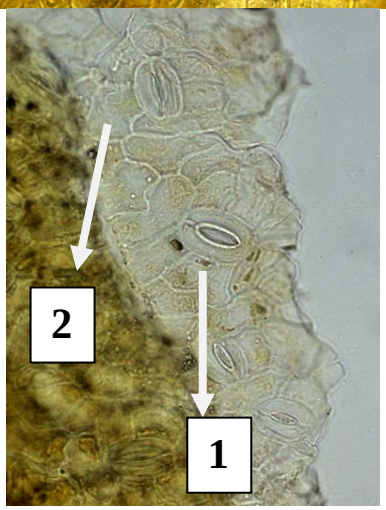



**Рисунок 4.2.7.** Лист *B. pendula*. Эпидерма нижней стороны листа. Погруженные устьица аномоцитного типа. Эпидермальные клетки слабо извилистостенные. Ув. х 40.
1 – устьица аномоцитного типа.
2 – клетки эпидермиса нижней стороны листа.

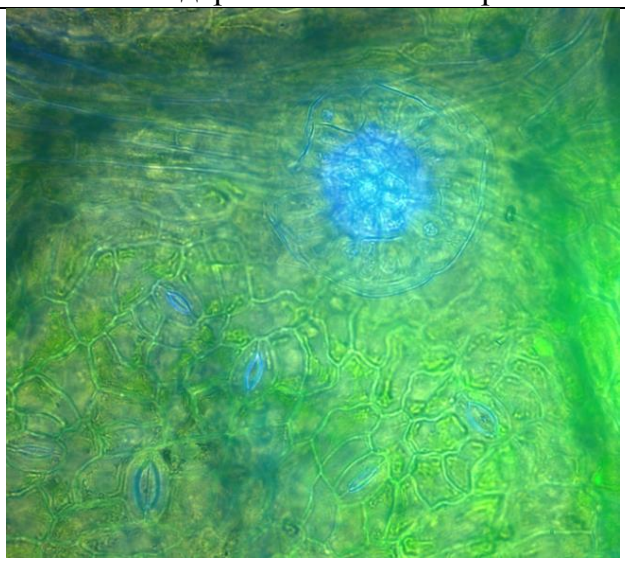


**Рисунок 4.2.8.** Лист *B. pendula*. Эпидерма нижней стороны листа, устьица, железки

(при рассмотрении в люминесцентный микроскоп). Ув. х 40.

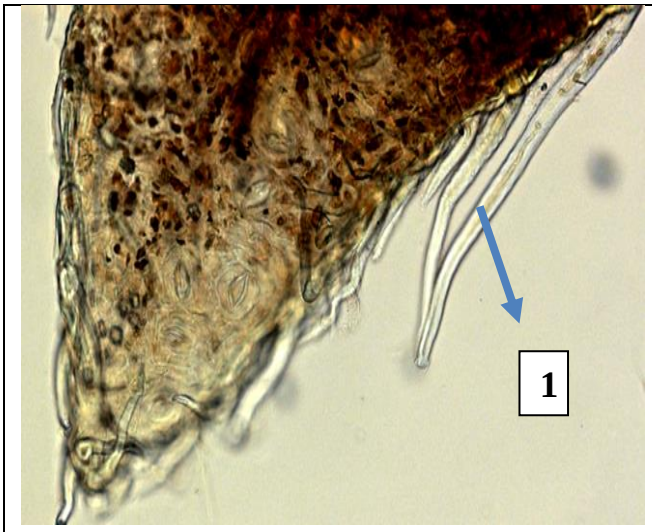



**Рисунок 4.2.9.** Лист *B. pendula.* Кончик листа с многочисленными волосками. Ув. х 40.
1 – простой железистый одноклеточный волосок.

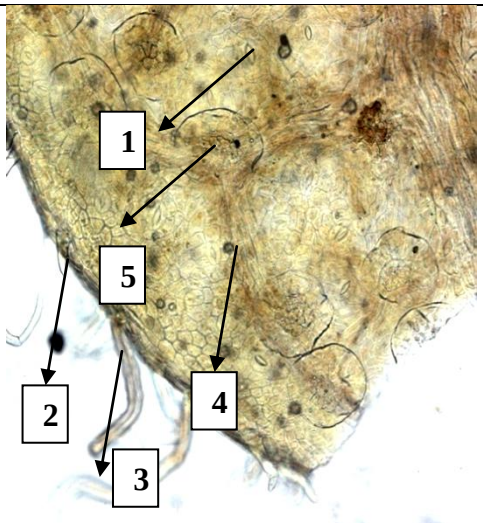
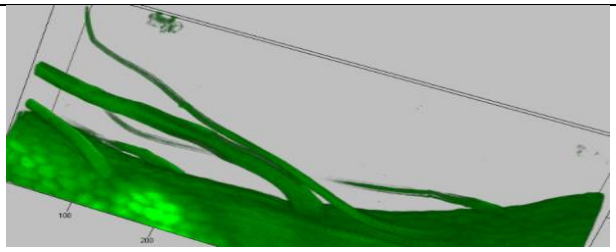



**Рисунок 4.2.10.** Лист *B. pendula.* Нижняя сторона листа, многочисленные железки, устьица, друзы, простые волоски по краю листовой пластинки. Ув. х 40.
1 – устьица аномоцитного типа.
2 – простой одноклеточный волосок.
3 – простой железистый одноклеточный волосок.
4 – друзы оксалата кальция.
5 – железка.



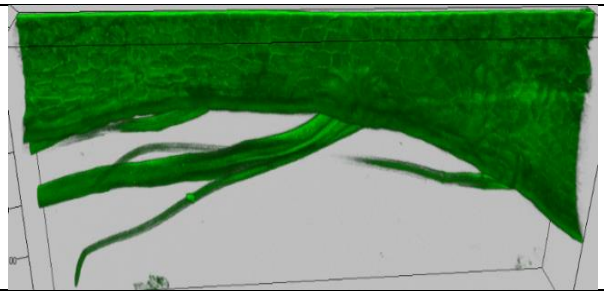


**Рисунок 4.2.11.** Лист *B. pendula.* Простые волоски по краю листовой пластинки. Ув. х 20. На конфокальном сканирующем лазерном микроскопе.

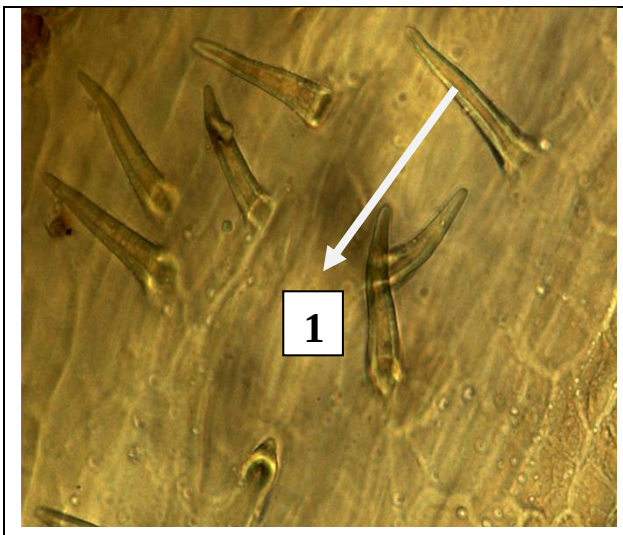



**Рисунок 4.2.12.** Лист *B. pendula.* Простые толстостенные короткие волоски. Ув. х 40.
1 – простой одноклеточный волосок.

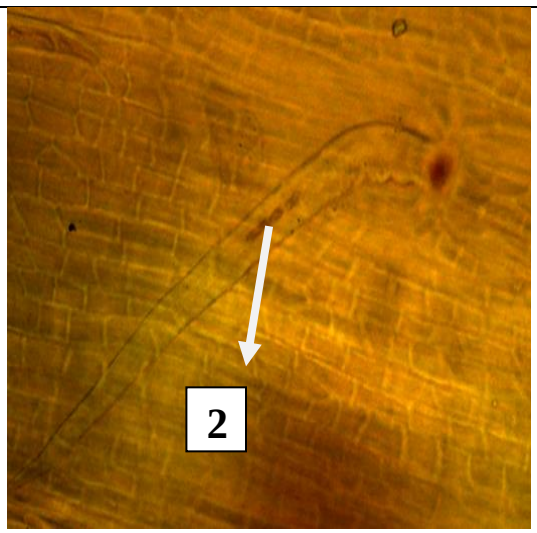



**Рисунок 4.2.13.** Лист *B. pendula.* Тонкостенный железистый волосок. Ув. х 40.
2 – простой железистый одноклеточный волосок.

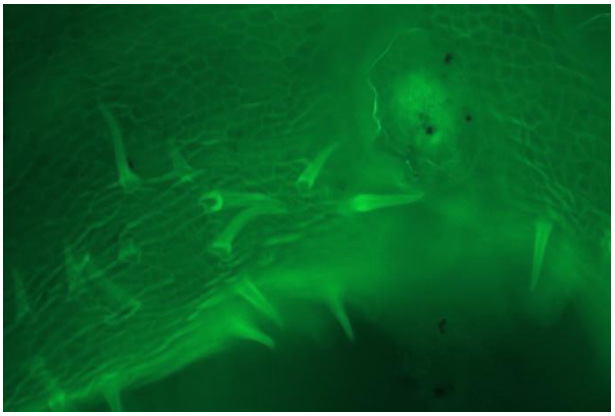


**Рисунок 4.2.14.** Лист *B. pendula.* Простые толстостенные короткие волоски (при рассмотрении в люминесцентный микроскоп). Ув. х 20.

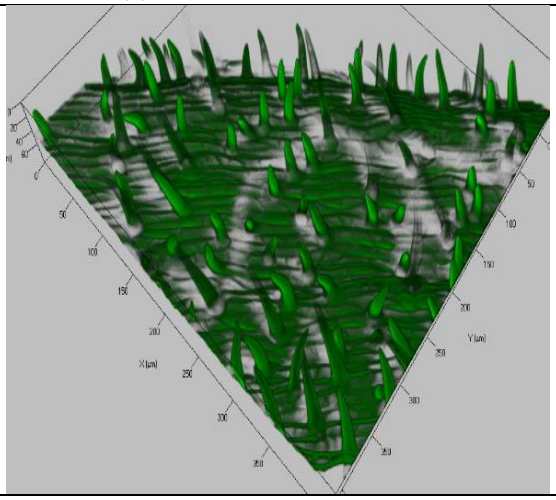


**Рисунок 4.2.15.** Лист *B. pendula.* Простые толстостенные короткие волоски. Ув. х 20. На конфокальном сканирующем лазерном микроскопе.

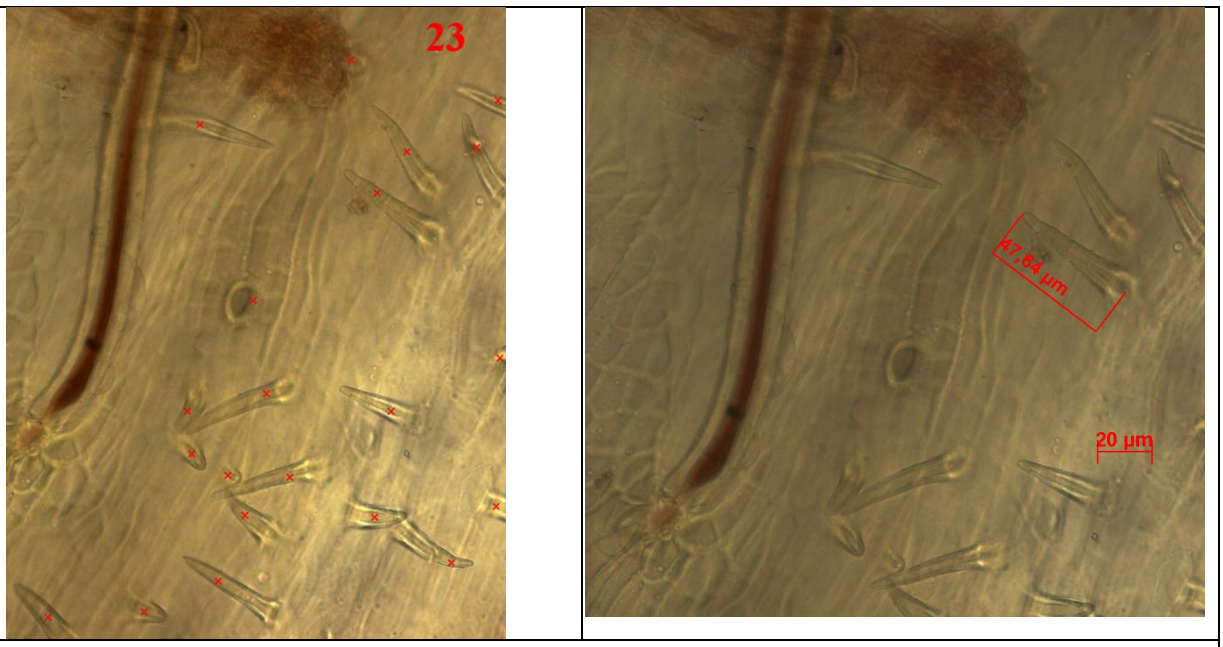



**Рисунок 4.2.16.** Лист *B. pendula.* Эпидерма над главной жилкой у основания листа, многочисленные трихомы – простые и железистые. Ув. х 40.

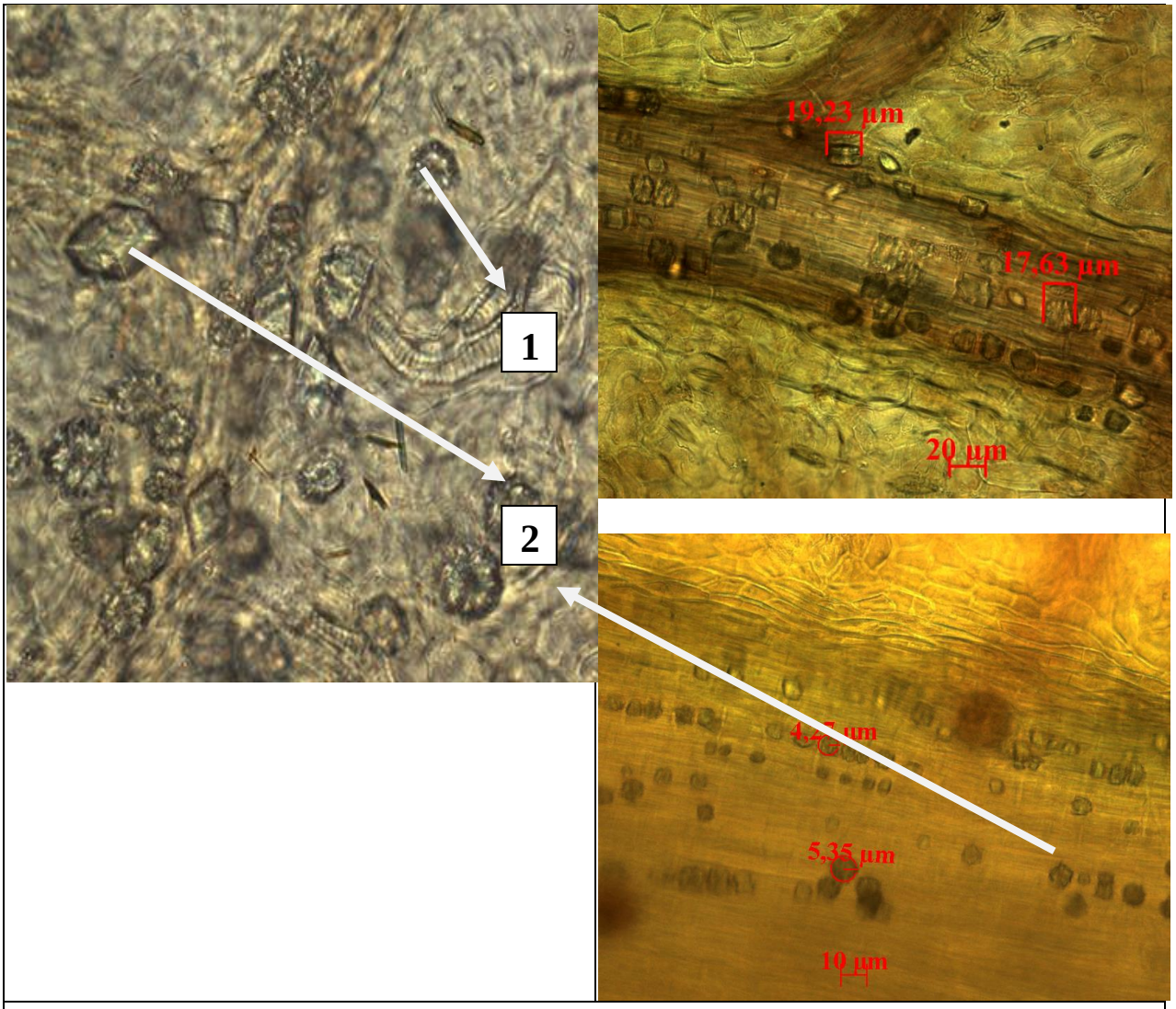



**Рисунок 4.2.17.** Лист *B. pendula.* Кристаллические включения – друзы,

призматические кристаллы. Ув. х 40.
**1 –** друзы оксалата кальция.
**2 –** призматические кристаллы оксалата кальция.

## Микроскопический анализ листа *B. pubescens*

Верхняя эпидерма листа представлена клетками, форма которых близка к изодиаметричной, боковые стенки эпидермальных клеток почти прямостенные (рис. 4.3.1). Над жилками клетки эпидермы вытянутой формы. На верхней стороне листа устьиц не обнаружено; редко встречаются железки, большей частью по жилкам (рис. 4.3.2.). Железки имеют сложное строение, в них наблюдается большое количество секреторных клеток, окруженных кутикулярным колпаком. Место прикрепления железок не углублено (рис. 4.3.2).

Эпидерма нижней стороны листа выполнена клетками разного размера и формы, клеточные стенки сильноизвилистые (рис. 4.3.3, 4.3.4, 4.3.5). Над жилками эпидермальные клетки прозенхимные и почти прямостенные (рис. 4.3.5, 4.3.10). На нижней стороне листа большое количество устьиц и железок (рис.4.3.4, 4.3.5). Устьица аномоцитного типа, погруженные (рис.4.3.3, 4.3.4, 4.3.5). На нижней эпидерме кутикула образует лучистую складчатость возле устьиц (рис. 4.3.4).

Верхушка листа закруглена (рис. 4.3.6). На верхушке листа, по краю листовой пластинки и по жилкам встречаются многочисленные трихомы, которые представлены простыми и железистыми одноклеточными волосками (рис. 4.3.7 – 4.3.10). Железистые волоски с коричневым содержимым (рис. 4.3.7). Размеры волосков и толщина их стенок сильно варьирует: встречаются тонкостенные и толстостенные короткие и очень длинные, тонкие и толстые. Особенно много волосков наблюдается по жилкам у основания листа (рис.4.3.10).

Кристаллические включения в виде друз в большом количестве наблюдаются в паренхиме листа и вдоль жилок (рис. 4.3.11). Вдоль жилок также отмечено наличие секреторных ходов с бурым содержимым (рис. 4.3.12).

Паренхима листа представлена клетками округлой и лопастной формы (рис. 4.3.13).

Обнаруженные при микроскопическом анализе диагностические признаки (простые одноклеточные волоски, железистые волоски, друзы оксалата кальция, устьица аномоцитного типа, бурые железки в форме гриба) листа березы пушистой схожи с микроскопическими признаками почек березы [171.1].

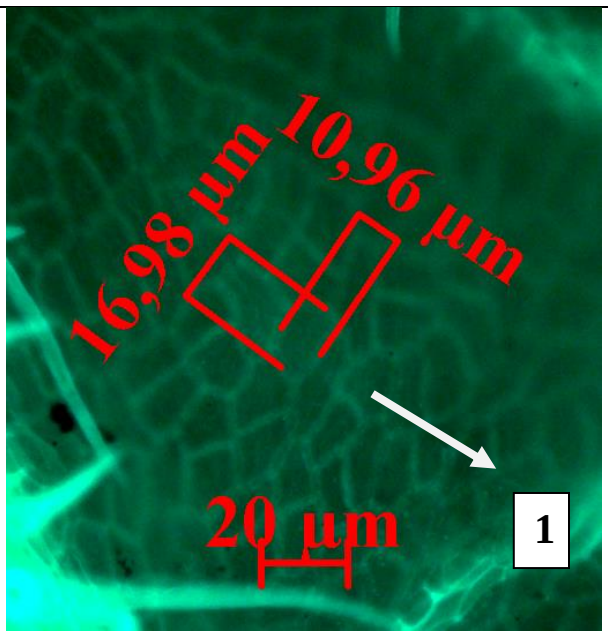
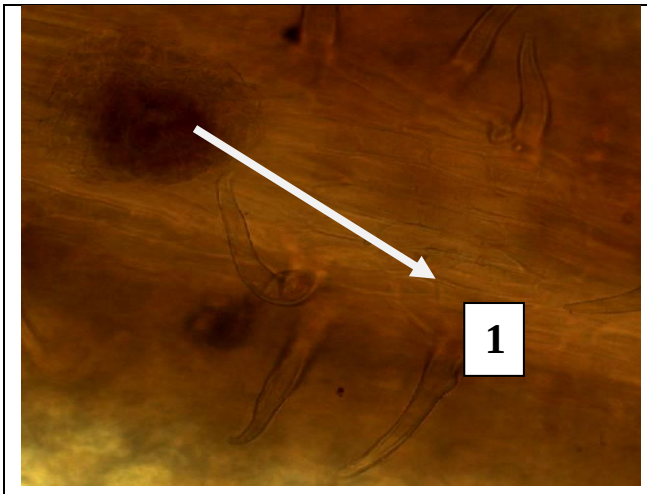
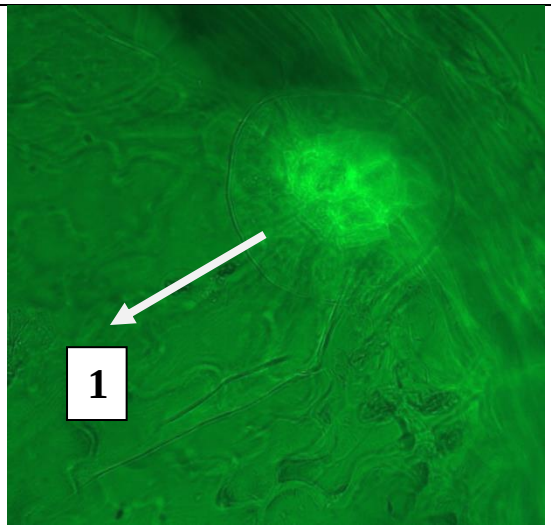


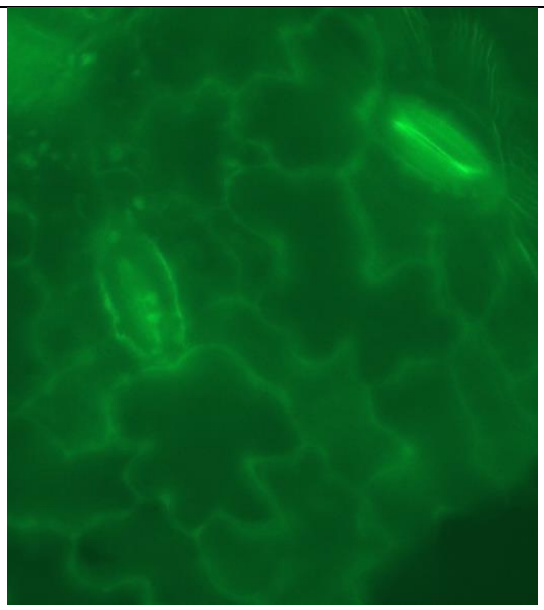

**Рисунок 4.3.1.** Лист *B. pubescens*. Эпидерма с верхней стороны листа (при рассмотрении в люминесцентный микроскоп). Ув. х 40.
1 – клетки эпидермиса.




(при рассмотрении в люминесцентный микроскоп)

**Рисунок 4.3.2.** Лист *B. pubescens*. Железка на жилке листа. Ув. х 40.
1 – железка.



(при рассмотрении в люминесцентный микроскоп)

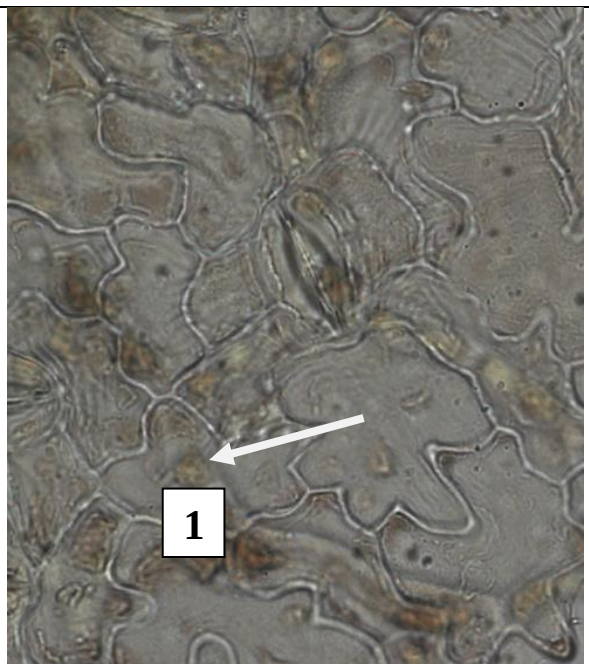
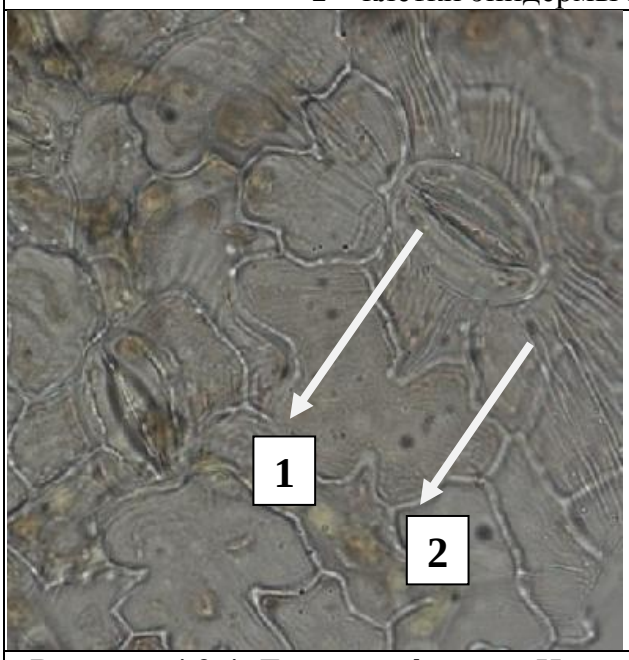



**Рисунок 4.3.3.** Лист *B. pubescens*. Эпидерма с нижней стороны листа. Устьица погруженные, клетки с сильноизвилистыми стенками. Ув. х 40.
1 – клетки эпидермы нижней стороны листа.



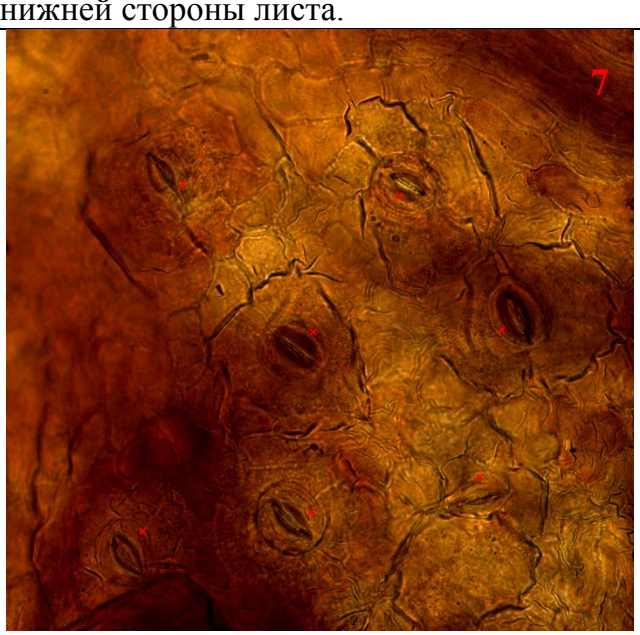
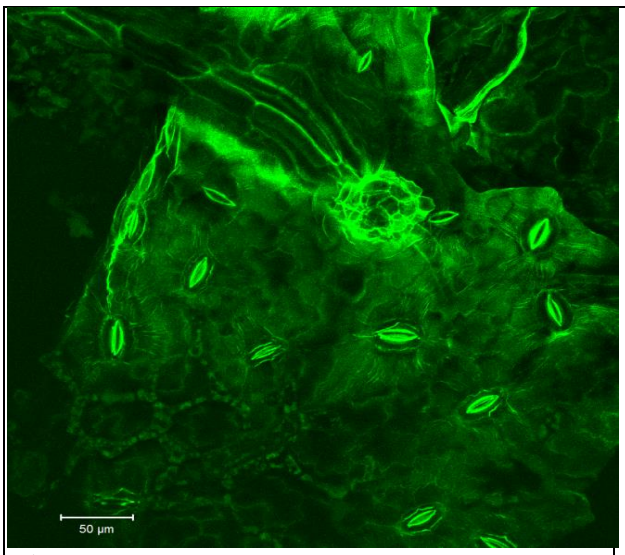




**Рисунок 4.3.4.** Лист *B. pubescens*. Нижняя сторона листа, эпидермальные клетки и устьица анамоцитного типа, погруженные, лучистая складчатость кутикулы. Ув. х 40.
1 – устьица аномоцитного типа.
2 – кутикула.




(при рассмотрении в люминесцентный микроскоп)

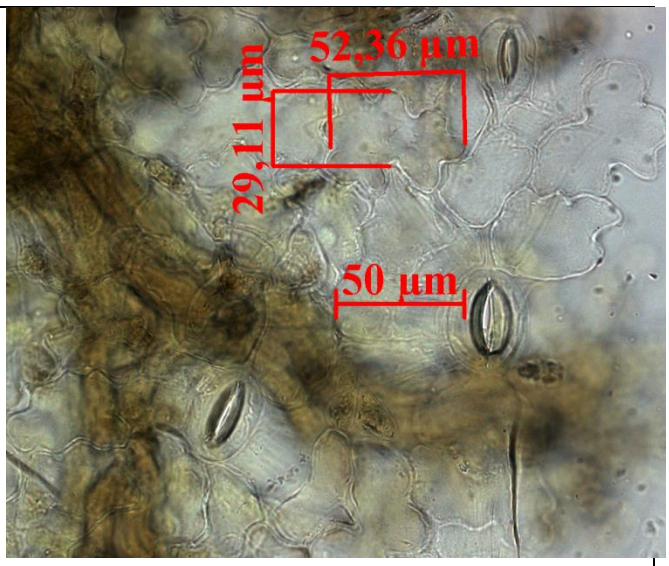



**Рисунок 4.3.5.** Лист *B. pubescens*.
Нижняя сторона листа, эпидерма, устьица, железка, паренхима. Ув. х 40.

**Рисунок 4.3.6.** Лист *B. pubescens*. Кончик листа (закруглен). Ув. х 20.

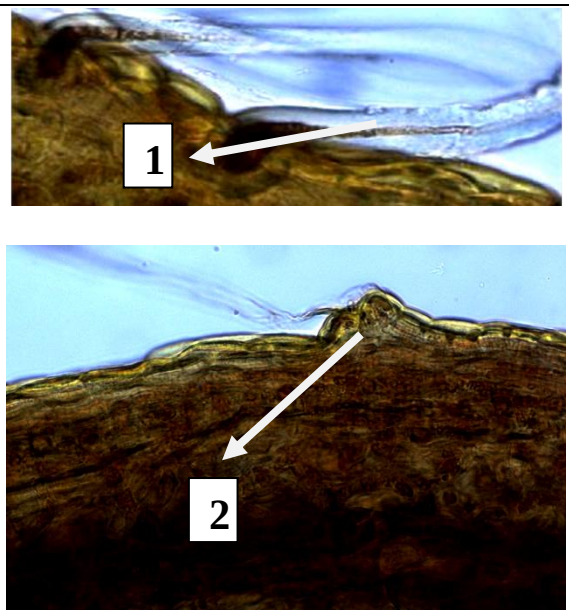



**Рисунок 4.3.7.** Лист *B. pubescens*. Край листовой пластинки, простые одноклеточные волоски, железистые. Ув. х 40.
1 – простой железистый одноклеточный волосок.
2 – место прикрепления волоска.

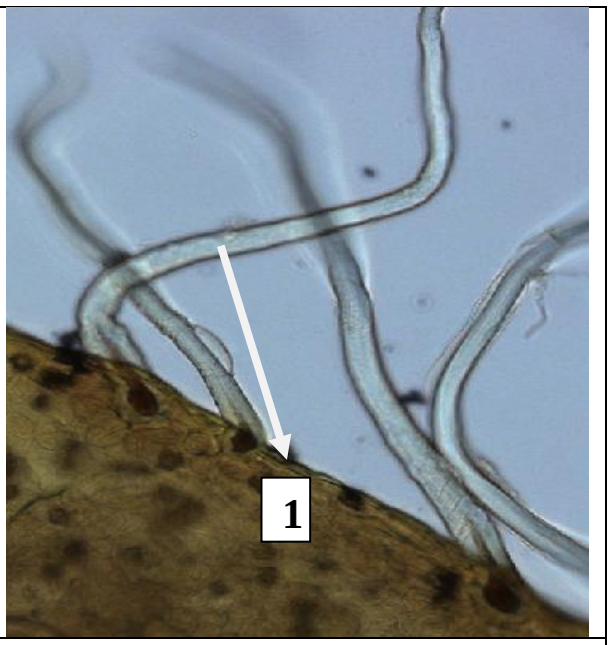



**Рисунок 4.3.8.** Лист *B. pubescens*. Одноклеточные волоски по краю листовой пластинки. Ув. х 40.
1 – простой одноклеточный волосок.

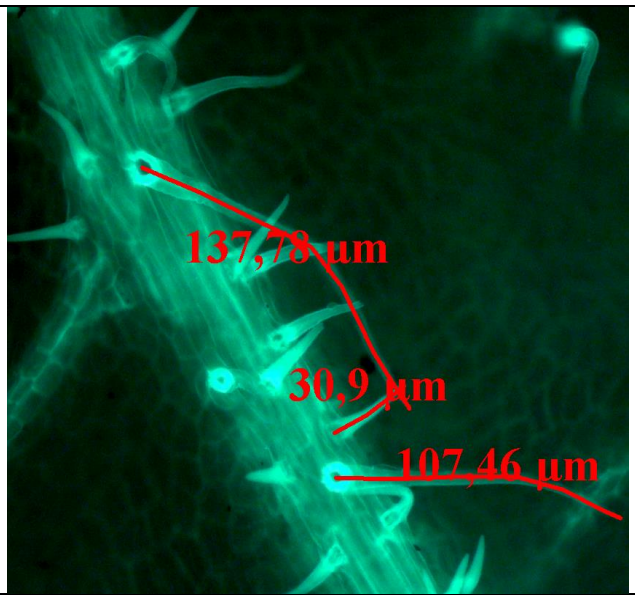



**Рисунок 4.3.9.** Лист *B. pubescens*.Трихомы по жилкам листа - простые одноклеточные волоски (при рассмотрении в люминесцентный микроскоп). Ув. х 40.

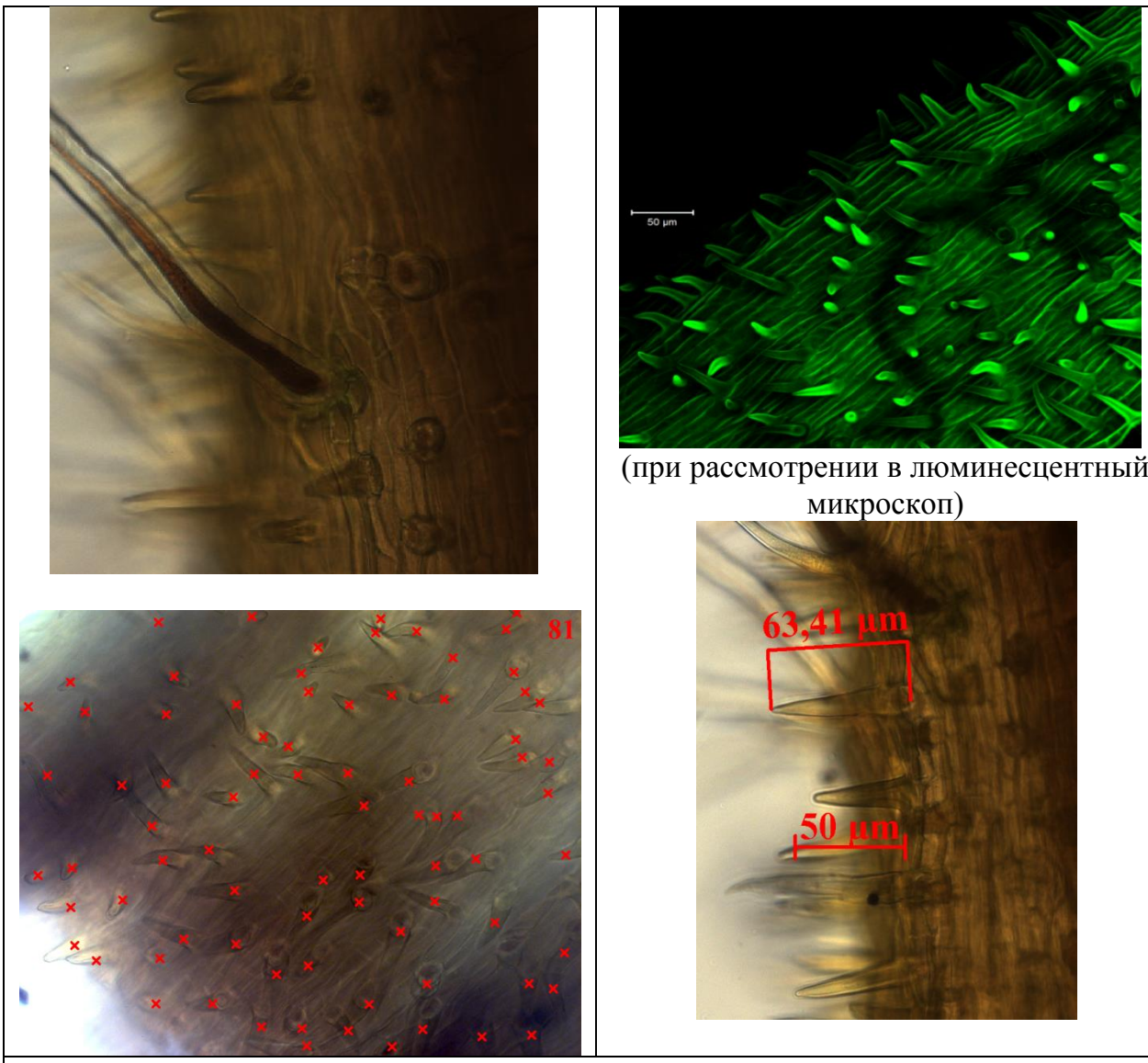



**Рисунок 4.3.10.** Лист *B. pubescens*.Трихомы на главной жилке у основания листа. Ув. х 40.

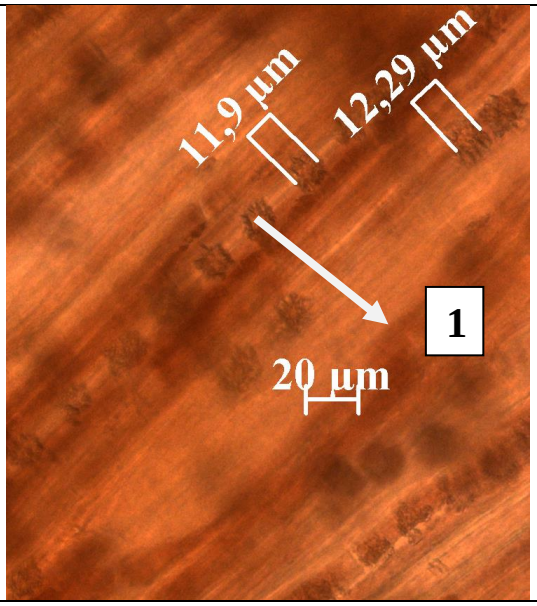



**Рисунок 4.3.11.** Лист *B. pubescens*.

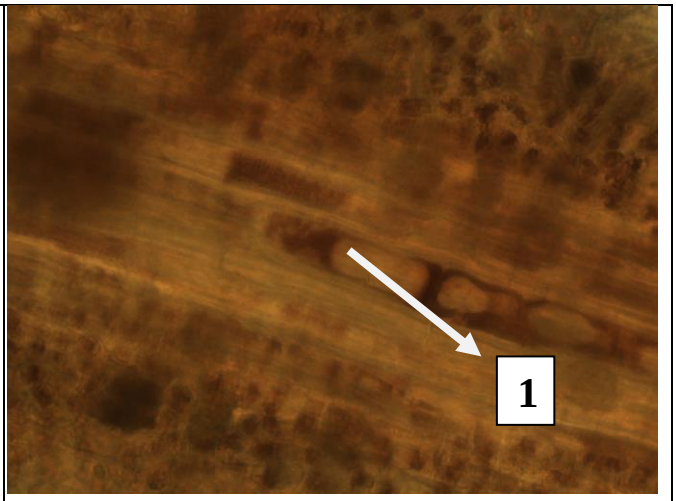
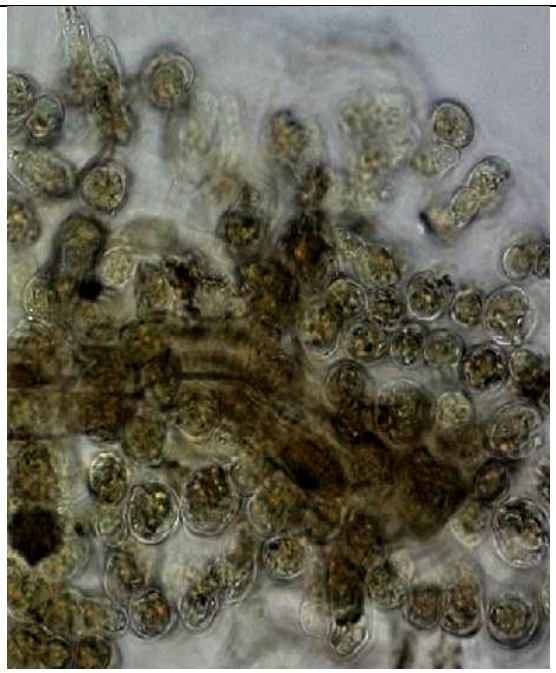



**Рисунок 4.3.12.** Лист

| | |
|---|---|
| Кристаллические включения вдоль жилки листа. Ув. х 40.<br>1 – друзы оксалата кальция. | *B. pubescens*.Секреторные канальца с бурым секретом, вдоль жилки листа. Ув. х 40.<br>1 – секреторные канальца. |



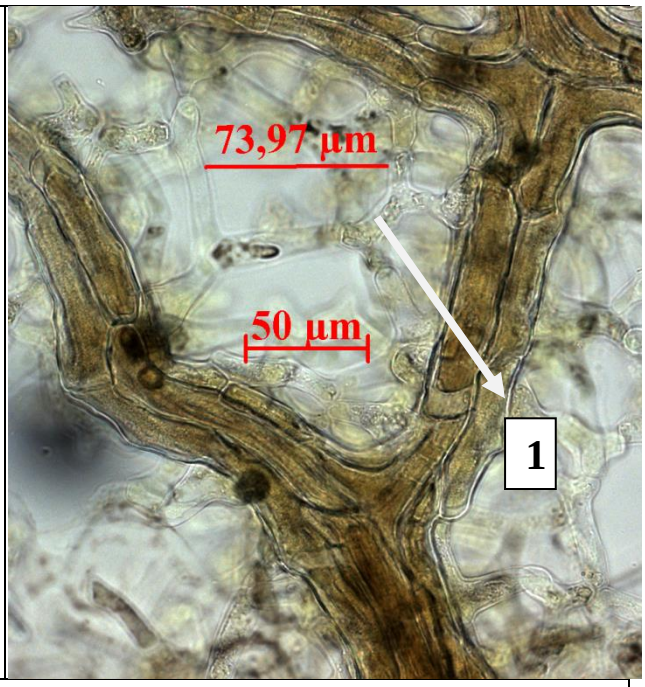



**Рисунок 4.3.13.** Лист *B. pubescens*. Паренхима листа. Ув. х 40.
1 –паренхима.

Таблица 4.2

**Отличительные признаки листьев *B. pendula* и *B. pubescens***

| Анализируемый признак | ***B. pendula*** | ***B. pubescens*** |
|---|---|---|
| **Нижняя эпидерма** | Клетки почти изодиаметричны, со слабоизвилистыми боковыми стенками | Клетки разнообразной формы и размеров с сильноизвилистыми боковыми стенками |
| **Железки (место прикрепления)** | Погруженные | Не погруженные |
| **Кутикула на нижней стороне листа** | Не выражена | Имеет лучистую складчатость, выраженную у устьиц |
| **Трихомы** | Трихомы на жилке у основания листа | Значительное количество на главной жилке у основания листа |
| **Секреторные ходы** | Не обнаружены | Секреторные канальца с бурым секретом, вдоль жилки листа |

### 4.1.3. Морфометрические диагностические признаки сырья – «Береста»

Для установления показателей подлинности нами были определены внешние признаки цельного и измельченного сырья.

***Цельное сырье.*** Куски бересты трубчатые, желобоватые, различной длины, толщиной 2-3 мм. Наружная поверхность матовая, более или менее гладкая. Внутренняя поверхность гладкая, блестящая. Береста с наружной и внутренней стороны имеет многочисленные заметные поперечно-вытянутые чечевички. Излом волокнистый, многослойный.

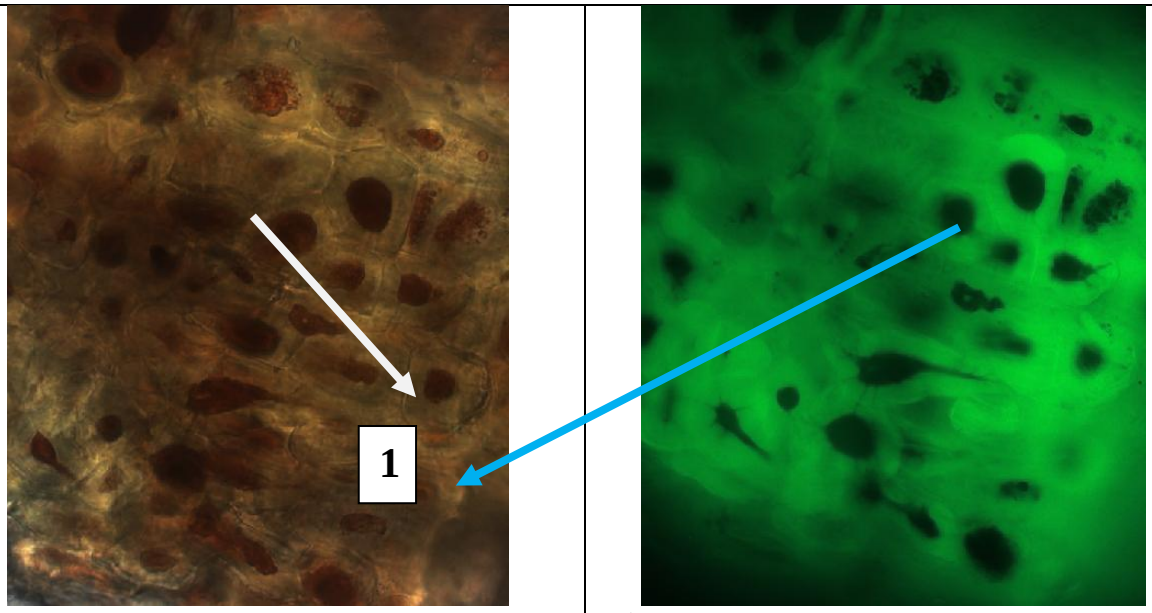
Цвет бересты снаружи белый, внутри светло-желтый. Запах слабый. Вкус вяжущий.

***Измельченное сырье.*** Кусочки бересты различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм. Цвет светло-бежевый. Запах своеобразный, приятный. Вкус вяжущий.

### 4.1.4. Микродиагностические признаки сырья – «Береста»

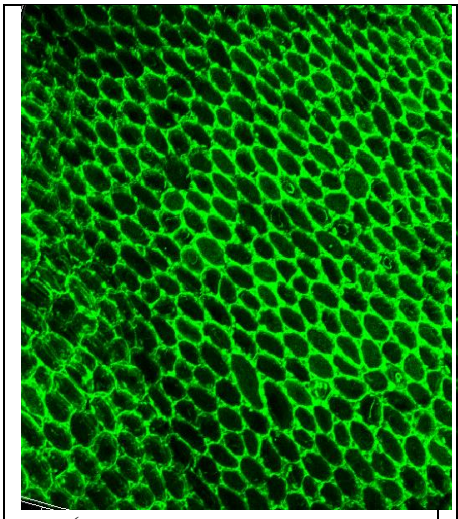
#### 4.1.4.1. Микроскопический анализ бересты *B. pendula*

На поперечном срезе бересты могут быть обнаружены клетки округлой формы с сильно утолщенными стенками при этом полость клеток узкая, заполнена воздухом, видны поровые канальца (рис. 4.4.1), а также со стенками без существенного утолщения (рис. 4.4.2, 4.4.3). На продольном срезе бересты наблюдаются клетки прозенхимные с заостренными двумя концами и с утолщенными стенками (рис.4.4.4 - 4.4.6).

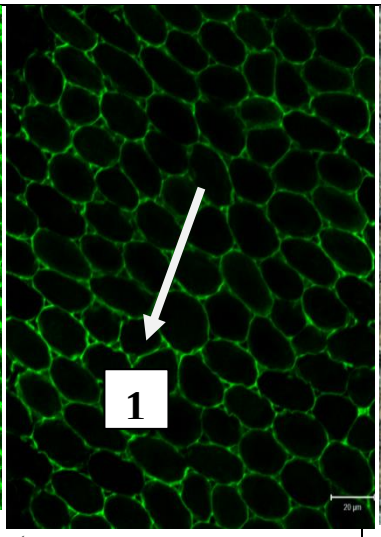



(при рассмотрении в люминесцентный микроскоп)

**Рисунок 4.4.1.** Поперечный срез бересты *B. pendula*. Ув. х 40.
1 – поровые канальца.



(при рассмотрении в люминесцентный микроскоп)




(при рассмотрении в люминесцентный микроскоп)

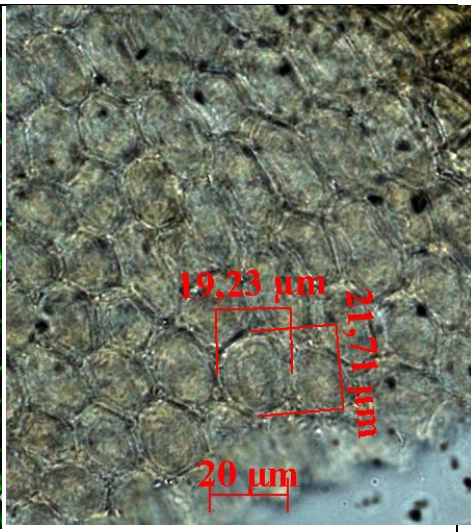



**Рисунок 4.4.2.** Поперечный срез бересты *B. pendula*. Ув. х 40.
1 – клетки пробки.

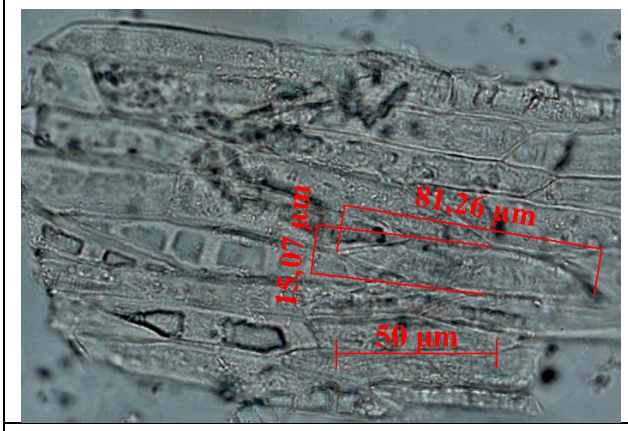
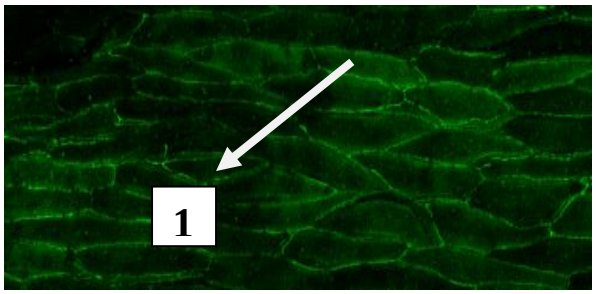
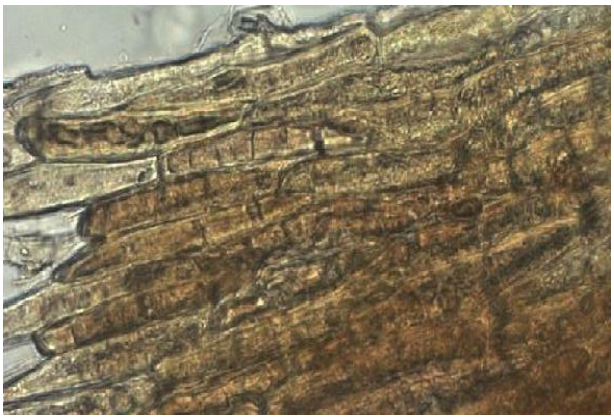


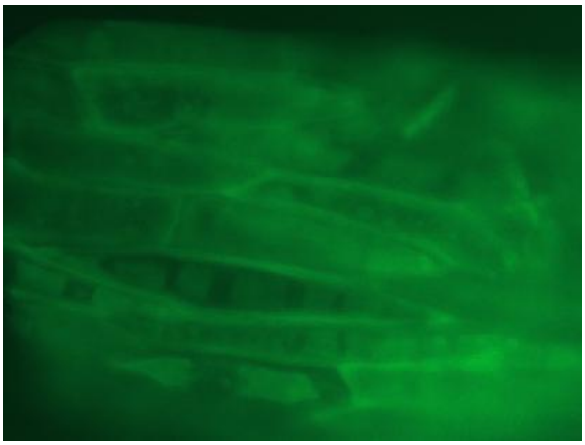

**Рисунок 4.4.3.** Продольный срез бересты *B. pendula*.. Ув. х 40.




(при рассмотрении в люминесцентный микроскоп)

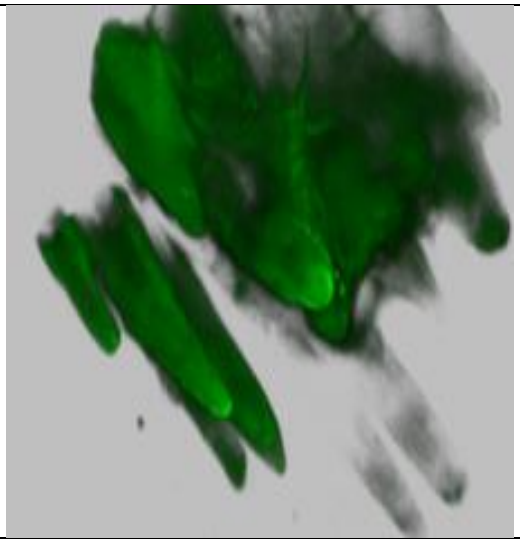
**Рисунок 4.4.4.** Продольный срез бересты. *B. pendula*. Ув. х 40.
1 – клетки пробки.





(при рассмотрении в люминесцентный микроскоп)

**Рисунок 4.4.5.** Продольный срез бересты *B. pendula*. Ув. х 40.



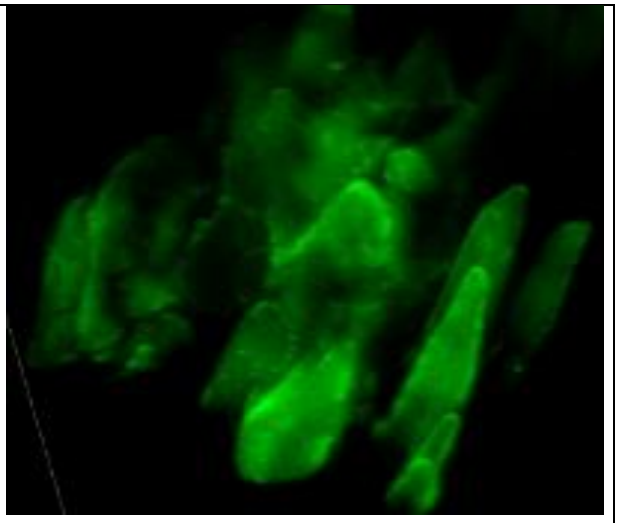


**Рисунок 4.4.6.** Фрагменты клеток бересты *B. pendula*
(на конфокальном сканирующем лазерном микроскопе). Ув. х 40.

### 4.1.4.2. Микроскопический анализ бересты *B. pubescens*

На поперечном срезе бересты могут быть обнаружены клетки округлой формы с сильно утолщенными стенками при этом полость клеток узкая, заполнена воздухом, видны поровые канальца (рис. 4.5.1), а также со стенками без существенного утолщения (рис. 4.5.2). На продольном срезе бересты наблюдаются клетки прозенхимные с заостренными двумя концами и с утолщенными стенками (рис. 4.5.3).

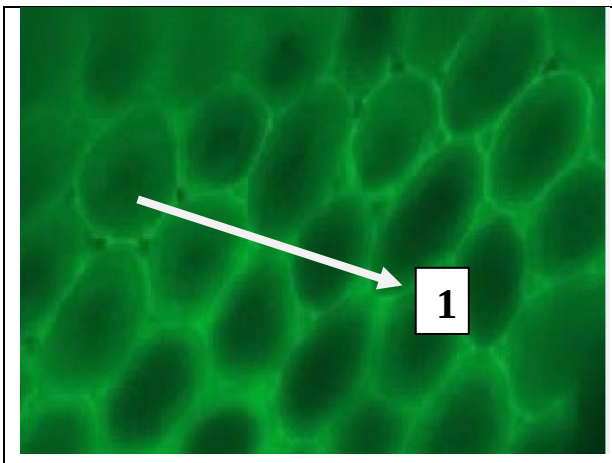



**Рисунок 4.5.1.** Поперечный срез бересты *B. pubescens* (при рассмотрении в люминесцентный микроскоп).
Ув. х 40.
1 – клетки пробки.

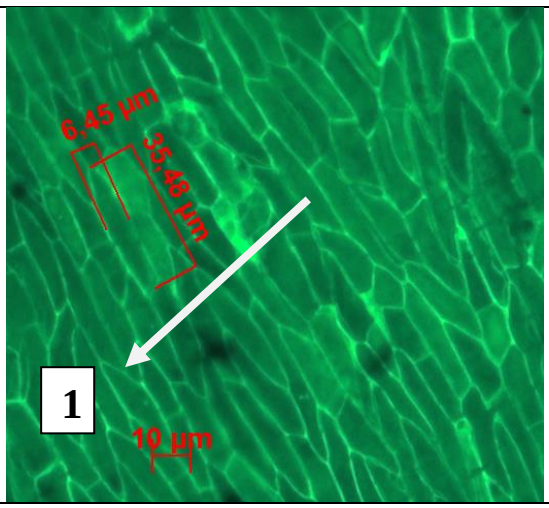
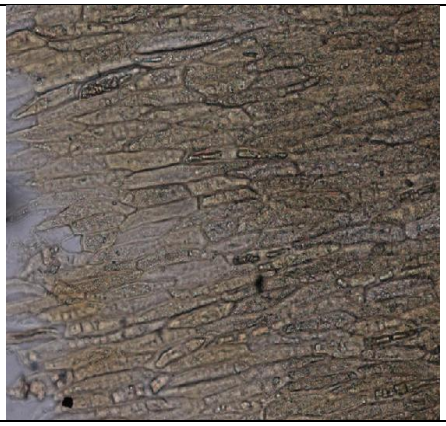
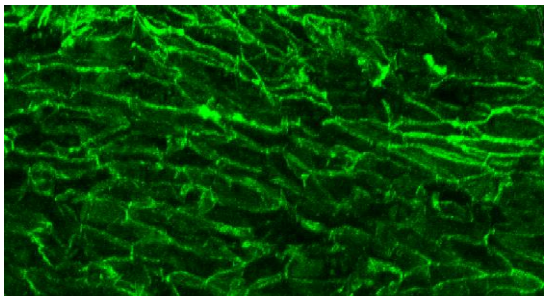



**Рисунок 4.5.2.** Продольный срез бересты *B. pubescens* (при рассмотрении в люминесцентный микроскоп).
Ув. х 40.
1 – клетки пробки.





(при рассмотрении в люминесцентный микроскоп)

**Рисунок 4.5.3.** Продольный срез бересты *B. pubescens*. Ув. х 40.

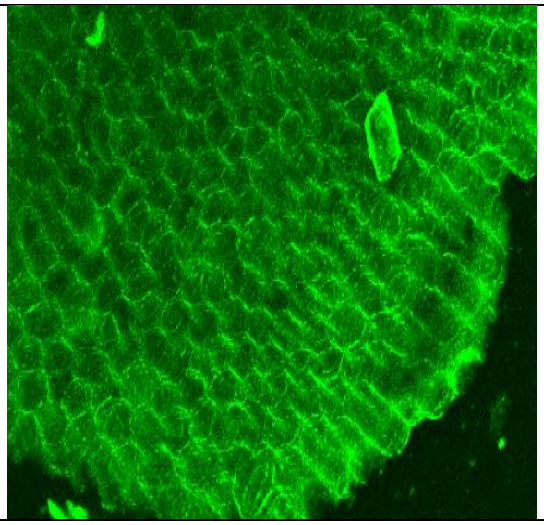


**Рисунок 4.5.4.** Фрагмент бересты *B. pubescens* (на конфокальном сканирующем лазерном микроскопе). Ув. х 40.

При сравнительном микроскопическом исследовании образцов бересты березы повислой и березы пушистой существенных различий выявлено не было.

### 4.1.5. Качественные фитохимические реакции на основные группы БАВ

Ранее было установлено, что доминирующими биологически активными веществами в бересте являются тритерпеновые сапонины и полифенольные (дубильные) соединения, поэтому для определения подлинность сырья «Береста» целесообразно проводить качественные реакции по данным группам веществ.

#### *4.1.5.1. Качественная реакция на тритерпеновые сапонины*

1) Реакция на сырье:

А) порошок бересты (около 0,1г) помещают в выпарительную чашку, приливают 1-2 капли 10%-ного раствора кислоты фосфорномолибденовой, слегка нагревают, появляется черно-синее окрашивание.

Б) порошок бересты (около 0,1г) помещают в выпарительную чашку, приливают 1-2 капли 25%-ного раствора кислоты фосфорновольфрамовой, слегка нагревают, появляется оранжевое окрашивание.

2) Около 1,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм, помещают в колбу вместимостью 50 мл, соединяют с обратным холодильником и экстрагируют водой очищенной в течение 30 минут на кипящей водяной бане при соотношении сырье-экстрагент 1:30. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр.

С полученным водным извлечением проводят реакцию пенообразования. Берут две пробирки, в одну приливают 5 мл 0,1 Н HCl, а во вторую – 5 мл 0,1 Н NAOH. Затем в обе пробирки добавляют по 1 мл водного извлечения и сильно встряхивают. При наличии в сырье тритерпеновых сапонинов в обеих пробирках образуется пена, равная по объему и стойкости.

#### *4.1.5.2. Качественная реакция на дубильные вещества*

Извлечение получают по схеме, приведенной выше (4.1.5.1. пункт 2).

К 2-3 мл извлечения добавляют 4-5 капель раствора железоаммонийных квасцов, появляется черно-синее окрашивание или осадок (присутствие гидролизуемых дубильных веществ).

## 4.2. Установление показателей качества

### 4.2.1. Методика количественного определения

**тритерпеновых сапонинов**

Для получения извлечения около 1,0 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц 3 мм, помещают в колбу с обратным холодильником и экстрагируют 96% спиртом этиловым на водяной бане в течение 30 мин с момента закипания экстрагента. Извлечение в горячем виде фильтруют через бумажный фильтр, который возвращают в колбу с сырьем. Экстракцию повторяют дважды в тех же условиях. Фильтраты объединяют и замеряют точный объем извлечения.

Оптическую плотность извлечений измеряют при длине волны 286 нм на приборе СФ-56 в кювете с толщиной слоя 10 мм. При величинах оптической плотности (D) более 0,8 необходимо проводить разведение извлечений. Определение суммы тритерпеновых сапонинов осуществляют в пересчете на бетулин. Раствор сравнения – 96% спирт этиловый.

**Содержание суммы тритерпеновых сапонинов (X) рассчитывают в процентах в пересчете на абсолютно-сухое сырье по формуле:**

$$X = D \times V_{изв} \times V_{разв} \times m_1 \times 100 / D_0 \times V_{ал} \times m \times V \times (100 - w),$$ где

D – оптическая плотность анализируемого раствора;

$V_{изв}$ – объем анализируемого извлечения, мл;

$V_{разв}$ – объем разведения анализируемого извлечения, мл;

$m_1$ – навеска ГСО бетулина, г;

$D_0$ – оптическая плотность раствора ГСО бетулина;

$V_{ал}$ – объем аликвоты анализируемого извлечения, мл;

m – навеска сырья, г;

V – объем раствора ГСО бетулина, мл;

W – потеря в массе при высушивании, %.

***Примечание:***

*Приготовление раствора ГСО бетулина:* 0,0617 г (точная навеска) ГСО бетулина помещают в мерную колбу на 25 мл, приливают 15 мл 96% спирта этилового, тщательно перемешивают (слегка нагревают на водяной бане, затем раствор охлаждают до комнатной температуры), доводят до метки 96% спиртом этиловым и перемешивают.

Метрологическая характеристика метода количественного определения в бересте тритерпеновых сапонинов в пересчете на бетулин представлена в таблице 4.3.

Таблица 4.3

**Метрологическая характеристика метода количественного определения тритерпеновых сапонинов в пересчете на бетулин в бересте**

| n | f | $x_{ср.}$ | $s^2$ | s | P, % | t (p, f) | $\Delta x_{ср.}$ | ε, % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 | 9 | 25,189 | 0,708 | 0,842 | 95 | 2,26 | 0,602 | 2,389 |

Для проверки воспроизводимости разработанной методики проводили 10 независимых определений для каждого образца сырья, относительные ошибки методики не превышали 5% [40, 41].

Предложенная методика количественного определения тритерпеновых сапонинов в пересчете на бетулин в бересте надежна и дает воспроизводимые результаты. Опыты с добавками образца РСО бетулина к исследуемому раствору показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки при использовании данной методики.

Содержание сапонинов в бересте должно быть не менее 15,0 %.

### 4.2.2. Методика количественного определения полифенольных окисляемых веществ (дубильных веществ)

Получение извлечения: около 1,0 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц 3 мм, помещают в коническую колбу объемом 50 мл, заливают 30 мл воды очищенной, колбу присоединяют к обратному холодильнику и выдерживают на водяной бане в течение 30 мин с момента закипания экстрагента. Извлечение в горячем виде фильтруют через бумажный фильтр, который возвращают в колбу с сырьем. Экстракцию повторяют дважды в тех же условиях. Фильтраты объединяют и замеряют точный объем извлечения.

Определение суммы дубильных веществ проводят в пересчете на танин в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 275 нм на приборе СФ-56. Раствор сравнения – вода очищенная.

**Расчет содержания дубильных веществ в пересчете на танин осуществляют по формуле:**

$$X=D\times V\times 100\%/K\times m\times(100-W), \text{ где}$$

V – объем извлечения, полученного из сырья, мл;

K – коэффициент пропорциональности, рассчитанный по калибровочному графику, построенному по стандартному веществу – танину;

D – оптическая плотность исследуемого раствора;

m – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Таблица 4.4

**Содержание дубильных веществ в водных извлечениях, полученных из образцов бересты**

***B. pendula* и *B. pubescens* в зависимости от места произрастания**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образцы* | Содержание дубильных веществ |
|---|---|
| 1 | 0,43±0,02 |
| 2 | 0,82±0,04 |
| 3 | 0,64±0,03 |
| 4 | 0,86±0,04 |
| 5 | 0,71±0,04 |
| 6 | 0,22±0,01 |
| 7 | 0,29±0,01 |
| 8 | 0,38±0,02 |

Обозначения*: 1 – береста *B. pendula,* березовый колок, Буготагские сопки (НСО); 2 - береста *B. pendula,* березовый лес, Чулымский район (НСО); 3 - береста *B. pendula,* березовый лес, Иркутская область; 4 - береста *B. pendula,* березовый колок, Венгеровский район (НСО); 5 – береста *B. pubescens,* Кудряшовский бор (НСО); 6 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Алтайский край; 7 - береста *B. pubescens,* хвойно-широколиственный лес, Костромская область; 8 - береста *B. pubescens,* опушка леса, Пермский край.

Таблица 4.5

**Содержание дубильных веществ в образцах бересты №№9,10,11,12,13,14, (собранной на разной высоте дерева)**

(в % , в пересчете на абсолютно сухое сырье)

| Образец №№ | Высота (м) | Содержание дубильных веществ |
|---|---|---|
| 9 | 1,2 | 0,59±0,03 |
| 10 | 2 | 0,58±0,03 |
| 11 | 3,2 | 0,58±0,03 |
| 12 | 5,7 | 0,56±0,03 |
| 13 | 12 | 0,54±0,03 |
| 14 | 14 | 0,57±0,03 |

Метрологическая характеристика метода количественного определения в бересте полифенольных окисляемых соединений в пересчете на танин представлена в таблице 4.6.

Таблица 4.6

**Метрологическая характеристика метода количественного определения полифенольных окисляемых соединений в пересчете на танин в бересте**

| n | f | $x_{ср.}$ | $s^2$ | s | P, % | t (p, f) | $\Delta x_{ср.}$ | ε, % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 | 9 | 0,831 | 0,00063 | 0,025 | 95 | 2,26 | 0,017 | 2,045 |

Для проверки воспроизводимости разработанной методики проводили 10 независимых определений для каждого образца сырья, относительные ошибки методики не превышали 5% [40, 41].

Предложенная методика количественного определения дубильных веществ в пересчете на танин в бересте надежна и дает воспроизводимые результаты. Опыты с добавками образца РСО танина к исследуемому раствору показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки при использовании данной методики.

Содержание дубильных веществ в бересте должно быть не менее 0,15%.

### 4.2.3. Определение товароведческих показателей бересты *B. pendula* и *B. pubescens*

#### *4.2.3.1. Определение влажности сырья*

Содержание влаги в лекарственном растительном сырье является показателем, характеризующим его доброкачественность. Влажность является обязательным условием хранения сырья, соблюдение его допустимых норм позволяет сохранить содержание действующих веществ в количестве, необходимом для проявления фармакологического действия.

Таблица 4.7

**Показатели влажности образцов бересты *B. pendula* и *B. pubescens***

(в %, в пересчете на абсолютно - сухое сырье)

| № образца | Вид березы | Место и дата сбора | Влажность, % |
|---|---|---|---|
| 1 | *B. pendula* | Тогучинский район, Новосибирская область (НСО), «Буготагские сопки», березовый колок | 2,65±0,13 |
| 2 | *B. pendula* | Колыванский район, НСО, березовый лес, 60 км от г.Новосибирска | 2,44±0,12 |
| 3 | *B. pendula* | 30 км от п. Лесогорска, Чунский район, Иркутская область, березовый лес | 2,62±0,13 |
| 4 | *B. pendula* | 15 км от п. Венгерово, Венгеровский район, НСО, березовый колок | 2,57±0,13 |
| 5 | *B. pubescens* | Колыванский район, НСО, Кудряшовский бор, 30 км от г. Новосибирска | 2,26±0,11 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 6 | *B. pubescens* | Прибрежная зона озера Сикачи, Волчихинский район, Алтайский край, хвойно-широколиственный лес | 2,31±0,12 |
| 7 | *B. pubescens* | Костромская область, Кологривский район, хвойно-широколистенный лес | 2,42±0,12 |
| 8 | *B. pubescens* | Пермский край, Верещагинский район, опушка леса | 2,53±0,13 |

При проведении анализа влажности бересты было установлено, что данный показатель варьирует в пределах от 2 до 3% в зависимости от вида березы и места произрастания (табл.4.7).

В результате, установлено, что влажность бересты составляет не более 3%.

### *4.2.3.2.Определение золы общей*

Зола общая является важным показателем качества лекарственного растительного сырья.

Показатель зольности отражает сумму неорганических веществ, свойственных растению, а также возможное присутствие минеральных примесей (земля, песок, пыль, камни).

Таблица 4.8

**Показатели золы общей образцов бересты**

***B. pendula* и *B. pubescens***

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| № образца | Вид березы | Место и дата сбора | Зола общая |
|---|---|---|---|
| 1 | *B. pendula* | Тогучинский район, Новосибирская область (НСО), «Буготагские сопки», березовый колок | 0,77±0,04 |
| 2 | *B. pendula* | Колыванский район, НСО, березовый лес, 60 км от г.Новосибирска | 0,92±0,05 |
| 3 | *B. pendula* | 30 км от п. Лесогорска, Чунский район, Иркутская область, березовый лес | 0,68±0,03 |
| 4 | *B. pendula* | 15 км от п. Венгерово, Венгеровский район, НСО, березовый колок | 0,73±0,04 |
| 5 | *B. pubescens* | Колыванский район, НСО, Кудряшовский бор, 30 км от г. Новосибирска | 0,81±0,04 |
| 6 | *B. pubescens* | Прибрежная зона озера Сикачи, Волчихинский район, Алтайский край, хвойно-широколиственный лес | 0,96±0,05 |
| | | Костромская область, Кологривский | 0,75±0,04 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 7 | *B. pubescens* | район, хвойно-широколистенный лес | |
| 8 | *B. pubescens* | Пермский край, Верещагинский район, опушка леса | 0,88±0,04 |

Проведенный анализ золы общей бересты позволил установить, что данный показатель находиться в пределах от 0,6 до 1,0% независимо от вида и места произрастания березы (табл. 4.8).

Таким образом, показатель зольности для бересты составляет не более 1%.

### *4.2.3.3. Определение экстрактивных веществ*

Одним из показателей качества лекарственного растительного сырья является показатель «экстрактивные вещества» (сухой остаток). Определение содержания экстрактивных веществ необходимо для стандартизации сырья.

При проведении анализа в качестве экстрагента использовались: спирт этиловый, водно-спиртовые смеси с содержанием спирта этилового 20%, 40%, 70%, 80% и вода очищенная.

Установлено, что наилучшим экстрагентом является 80% спирт этиловый. Выход веществ из бересты *B. pendula* составил 35,83%, *B. pubescens* - 33,06%. Наименьшее содержание наблюдалось при использовании воды очищенной 2,26% и 2,72% соответственно (табл.4.9).

Таблица 4.9

**Содержание экстрактивных веществ в образцах бересты**

***B. pendula* и *B. pubescens***

(в %, в пересчете на абсолютно сухое сырье)

| **Экстрагент** | **Образец** | |
|---|---|---|
| | B. pendula ( №2) | B. pubescens (№5) |
| **Вода очищенная** | 2,26±0,11 | 2,72±0,14 |
| **20% спирт этиловый** | 3,94±0,20 | 3,11±0,16 |
| **40% спирт этиловый** | 4,85±0,24 | 5,10±0,26 |
| **70% спирт этиловый** | 30,34±1,52 | 24,84±1,24 |
| **80% спирт этиловый** | 35,83±1,79 | 33,06±1,65 |
| **96% спирт этиловый** | 35,12±1,76 | 34,58±1,73 |

Таким образом, показатель «экстрактивные вещества» (сухой остаток) для бересты составляет не менее 30,0% при использовании в качестве экстрагента 80% спирт этиловый.

### *4.2.3.4. Ситовой анализ сырья*

Для установления размера частиц измельченного сырья бересты (100г) использовался набор сит с размерами ячеек: 7; 5; 3; 2; 1; 0,7; 0,5 и 0,315 мм (табл. 4.10).

Таблица 4.10

**Результаты ситового анализа измельченного сырья бересты (в %)**

| Размер ячейки сита | **Образцы** | |
|---|---|---|
| | ***B. pendula* (№2)** | ***B. pubescens* (№5)** |
| Количество частиц, не проходящих сквозь сито с ячейками 7 мм | 1,34±0,06 | 1,57±0,07 |
| Количество частиц, проходящих сквозь сито с ячейками 7 мм | 9,98±0,49 | 11,23±0,56 |
| Количество частиц, проходящих сквозь сито с ячейками 5 мм | 20,42±1,02 | 23,21±1,16 |
| Количество частиц, проходящих сквозь сито с ячейками 3 мм | 32,87±1,64 | 34,11±1,70 |
| Количество частиц, проходящих сквозь сито с ячейками 2 мм | 25,83±1,29 | 22,23±1,11 |
| Количество частиц, проходящих сквозь сито с ячейками 1 мм | 5,65±0,28 | 3,45±0,17 |
| Количество частиц, проходящих сквозь сито с ячейками 0,7 мм | 1,30±0,06 | 1,73±0,08 |
| Количество частиц, проходящих сквозь сито с ячейками 0,5 мм | 1,31±0,06 | 1,48±0,07 |
| Количество частиц, проходящих сквозь сито с ячейками 0,315 мм | 0,86±0,04 | 0,75±0,03 |

По результатам анализа установлено, что количество частиц в измельченной бересте, не проходящих сквозь сито с ячейками 7 мм, не превышает 2,0%, а частиц, проходящих сквозь сито с ячейками 0,315 мм – 1,0% (табл. 4.10).

### *4.3. Установление сроков хранения сырья*

Для установления срока годности сырья – «Береста» проанализированы показатели подлинности и доброкачественности: содержание действующих веществ, числовые показатели – влажность, зольность. Все измерения проводили в трехкратной повторности в течение 4 лет через определенные промежутки времени.

По результатам исследования (табл. 4.11) установлено, что предварительный срок хранения сырья «Береста» - 4 года.

Таблица 4.11

**Установление сроков хранения сырья – «Береста»**

***B. pendula* и *B. pubescens***

| Вид | Срок хранения | Условия хранения | Описание | Подлинность | Зола общая, % | Потеря в массе при высушивании, % | Тритерпеновые сапонины, % | Дубильные вещества, % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **B. pendula (№2)** | Исходно | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,92 | 2,44 | 23,65 | 0,81 |
| | 0,5 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,95 | 2,42 | 23,67 | 0,83 |
| | 1 год | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,89 | 2,43 | 23,64 | 0,82 |
| | 1,5 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,91 | 2,40 | 23,62 | 0,81 |
| | 2 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,93 | 2,38 | 23,62 | 0,81 |
| | 3 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,91 | 2,37 | 23,61 | 0,82 |
| | 3,5 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,90 | 2,37 | 23,60 | 0,80 |
| | 4 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,89 | 2,35 | 23,61 | 0,81 |
| **B. pubescens ( №5)** | Исходно | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,81 | 2,26 | 27,65 | 0,73 |
| | 0,5 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,84 | 2,23 | 27,63 | 0,74 |
| | 1 год | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,82 | 2,22 | 27,64 | 0,73 |
| | 1,5 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,79 | 2,20 | 27,61 | 0,71 |
| | 2 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,80 | 2,21 | 27,62 | 0,73 |
| | 3 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,83 | 2,18 | 27,61 | 0,73 |
| | 3,5 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,82 | 2,16 | 27,62 | 0,72 |
| | 4 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 0,82 | 2,16 | 27,60 | 0,72 |

Таким образом, для предполагаемого виды сырья – «Береста» определены морфометрические и микродиагностические признаки, качественные реакции на основные группы БАВ. Разработаны методы количественного анализа тритерпеновых сапонинов (в пересчете на бетулин) и дубильных веществ (в пересчете на танин) в сырье – «Береста». Установлены показатели качества сырья:

содержание действующих веществ (тритерпеновые сапонины, дубильные вещества), допустимые нормы влажности, зола общая, пределы измельченности. Определен предварительный срок хранения сырья «Береста» - 4 года.

# ГЛАВА 5. МЕХАНОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ БЕРЕСТЫ

Разными авторами в разное время для повышения выхода действующих веществ из бересты использовались разные приемы и методы [77]. Нами для повышения выхода основных групп БАВ из бересты использовалась механохимическая активация.

При интенсивном механохимическом воздействии происходят изменения нагрузки на исходное растительное сырьё с большой скоростью. При этом способе воздействия возникают явления, которые значительно отличаются от процессов классического («мягкой обработки») измельчения. Радикальные изменения наблюдаются в структуре и текстуре материала. Происходит возрастание избыточной свободной энергии системы, разрыв межмолекулярных связей, стабилизирующих надмолекулярную структуру природных органических полимеров, понижение плотности, возрастание площади поверхности, изменение валентных углов и межмолекулярных расстояний полимерных цепей, ослабление кристалличности. Все эти процессы объединяются под названием механохимической активации [93]. При этом помимо образования новой поверхности, из-за уменьшения частиц происходит также существенное нарушение вторичной структуры материала. Вслед за измельчением происходит деструкция полимерных цепей.

Данный метод измельчения сырья выгодно отличается отсутствием какого-либо химического и (или) термического воздействия. Нагрев исходного растительного сырья до 70-80 °С за счет воздействия на него мелющих тел носит кратковременный характер и не сказывается отрицательно на свойствах, составе и качестве конечного продукта [201].

Изменения свойств растительного сырья, вызванные механохимической активацией можно рассматривать с двух точек зрения - во-первых, как неизбежное явление, сопровождающее механическое воздействие на природные органические полимеры, во-вторых, как желательное изменение свойств полимерных твердых материалов, направленное на получение продуктов со специфическими и (или) заданными характеристиками [131].

Таким образом, следующим этапом работы было исследование влияния механохимической активации на компонентный состав и количественное содержание основных групп биологически активных веществ бересты.

Для сравнительного исследования были взяты образцы бересты, измельченные классическим методом (КИБ) и образцы бересты, подвергшиеся механохимической активации (МХИБ).

## 5.1. Общий фитохимический анализ образцов КИБ и МХИБ

При проведение сравнительного общего фитохимического анализа образцов КИБ и МХИБ было установлено, что по составу, обнаруженных БАВ, исследуемые образцы не различаются (табл. 5.1).

Таблица 5.1

**Результаты сравнительного общего фитохимического анализа КИБ и МХИБ**

| Качественная реакция, реактив | Образец | |
|---|---|---|
| | **КИБ** | **МХИБ** |
| **Тритерпеновые сапонины** | | |
| Пенообразования | + | + |
| Реакция *Лафона* | + | + |
| 25%-ный раствор кислоты фосфорновольфрамовой | + | + |
| 10%-ный раствор кислоты фосфорномолибденовой | + | + |
| **Дубильные вещества** | | |
| 10% водный раствор $FeNH_4(SO_4)_2$ | + | + |
| Бромная вода | + | + |
| 10% раствор $CH_3COOH$ и 10% раствор $Pb(CH_3COO)_2$ | + | + |
| 1% раствор $FeNH_4(SO_4)_2$ и 10% раствор $Pb(CH_3COO)_2$ | + | + |
| **Флавоноиды** | | |
| Проба *Chinoda* | + | + |
| 5% раствор $AlCl_3$ | + | + |
| **Кумарины** | | |
| Лактонная проба | + | + |
| Реакция *Паули* | + | + |
| **Гидроксикоричные кислоты** | | |
| Реакция *Паули* | + | + |
| **Алкалоиды** | | |
| Общеосадительные реактивы: *Драгендорфа, Вагнера, Бушарда, Майера, Марме* | - | - |
| **Полисахариды** | | |
| 95% спирт этиловый (1:3) | + | + |
| **Аминокислоты** | | |
| Реакция *Руэмана* | + | + |

## 5.2. Анализ качественного состава и количественного содержания образцов КИБ и МХИБ

### 5.2.1. Тритерпеновые сапонины

### *Количественное содержание*

При определении количественного содержания тритерпеновых сапонинов методом (2.8.1) в извлечениях, полученных из образцов КИБ и МХИБ (экстрагент 96% спирт этиловый) было установлено, что механохимическая активация приводит к значительному увеличению их выхода (на 14%) (табл. 5.2, рис. 5.1).

Таблица 5.2

**Содержание тритерпеновых сапонинов в образцах КИБ и МХИБ**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образцы | Содержание тритерпеновых сапонинов ( в пересчете на бетулин) |
|---|---|
| КИБ | 30,60±1,53 |
| МХИБ | 44,19±2,21 |

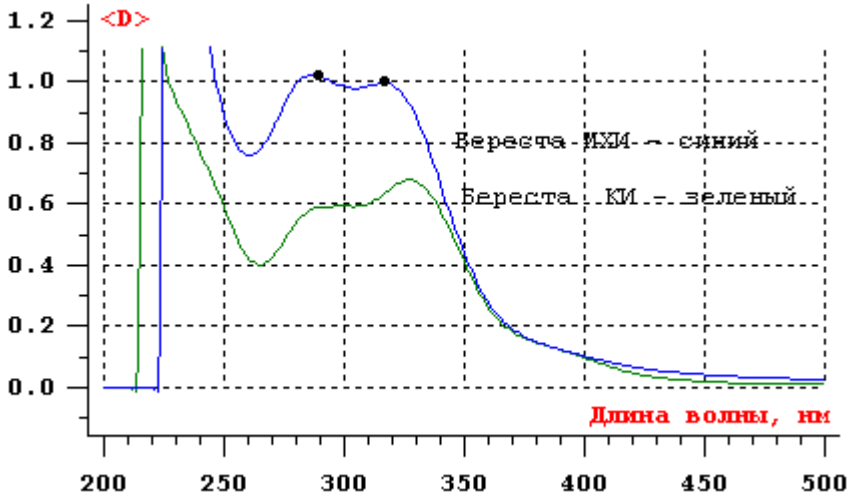



**Рисунок 5.1.** Электронные спектры поглощения суммарных извлечений из образцов КИБ и МХИБ (экстрагент - 96% спирт этиловый)

## 5.2.2. Кумарины

### *Анализ качественного состава и количественного содержания*

Для проведения сравнительного хроматографического анализа компонентного состава кумаринов из образцов КИБ и МХИБ получена очищенная сумма кумаринов от сопутствующих веществ методом (2.8.3.2.) (рис. 5.2, 5.3).

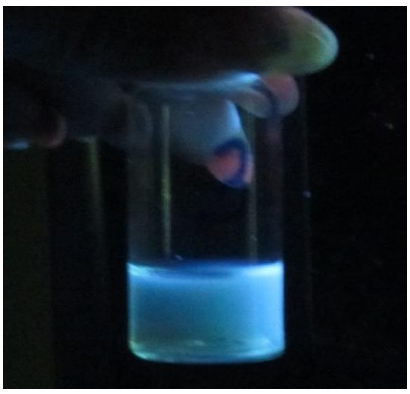


**Рисунок 5.2.** Очищенная сумма кумаринов из образца КИБ в УФ - свете

**Рисунок 5.3.** Очищенная сумма кумаринов из образца МХИБ в УФ - свете

В результате хроматографического исследования в образце КИБ установлено наличие 10 веществ, в образце МХИБ – 12, из которых идентифицирован кумарин (рис. 5.4, 5.5 (см в прил.),табл. 5.3).

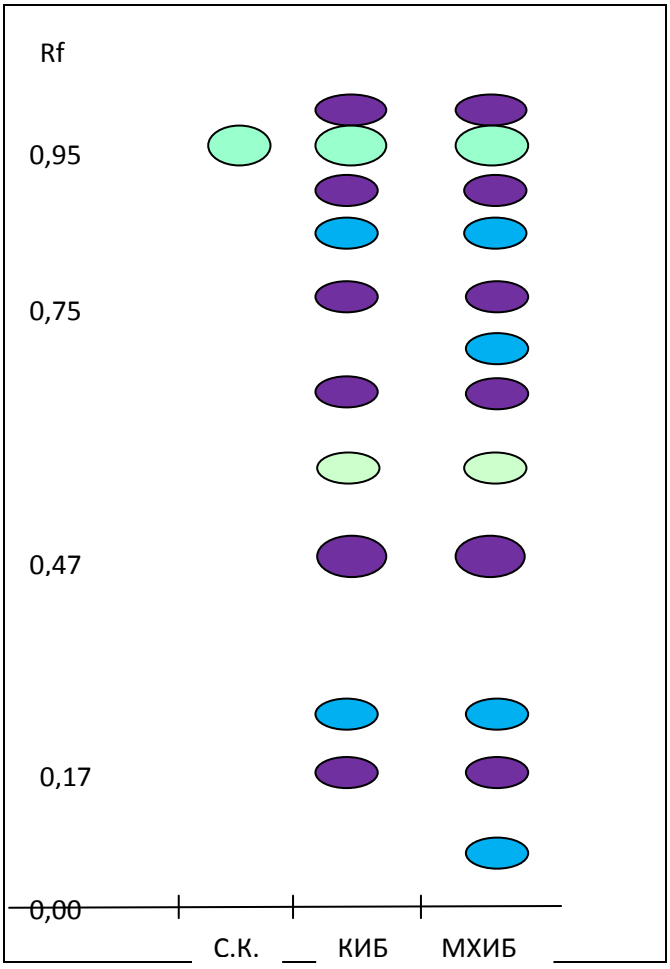



**Рисунок 5.4.** Схема хроматограммы кумаринов из образцов КИБ и МХИБ, свидетеля – кумарина (С.К.)

*Примечания.* Условия хроматографии: пластинка «Sorbfil», система растворителей: толуол-эфир диэтиловый(4:6), насыщенные 10% кислотой уксусной.

Таблица 5.3

**Результаты хроматографического исследования кумаринов в образцах КИБ и МХИБ**

| Система | Вещество | Rf | Свечение в УФ - свете | | Окраска пятен после реакции азосочетания | Образцы | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | До | После | | | |
| | | | обработки 5% спиртовым раствором NaOH | | | КИБ | МХИБ |
| **толуол-эфир диэтиловый (4:6), насыщенные 10% кислотой уксусной** | Не идентифицировано | 0,11 | голубое | голубое | розовое | - | + |
| | Не идентифицировано | 0,17 | | фиолетовое | розовое | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,26 | | голубое | желтое | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,47 | голубое | фиолетовое | розовое | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,53 | | зелено-голубое | желтое | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,62 | фиолетовое | фиолетовое | оранжевое | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,71 | голубое | голубое | розовое | - | + |
| | Не идентифицировано | 0,75 | фиолетовое | фиолетовое | оранжевое | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,81 | | голубое | желтое | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,85 | | фиолетовое | розовое | + | + |
| | Кумарин | 0,95 | голубое | зелено-голубое | оранжевая | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,98 | фиолетовое | фиолетовое | желтая | + | + |

Определение количественного содержания кумаринов проводили прямым спектрофотометрическим методом в извлечениях из образцов КИБ и МХИБ, очищенных от сопутствующих веществ.

Установлено, что механохимическая активация бересты приводит к увеличению выхода кумаринов почти в 3 раза (табл. 5.4).

Таблица 5.4

**Содержание кумаринов в образцах КИБ и МХИБ**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образцы | Содержание кумаринов (в пересчете на кумарин) |
|---|---|
| КИБ | 0,25±0,01 |
| МХИБ | 0,75±0,04 |

Таким образом, механохимическая активация влияет на компонентный состав кумаринов и приводит к значительному увеличению выхода данной группы веществ из бересты.

### 5.2.3. Полифенольные окисляемые соединения (дубильные вещества)

***Анализ качественного состава и количественного содержания***

При проведение общего фитохимического анализа было установлено, что в сумме полифенольных окисляемых соединений (дубильных веществ) образцов МХИБ и КИБ преобладает гидролизуемая группа.

Определение количественного содержания дубильных веществ проводили по методу (пункт 3.4). Извлечения получены из образцов бересты последовательной экстракцией 96%, 70%, 40%, 20% и водой очищенной.

Определение суммы полифенольных окисляемых веществ осуществляли в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 275 нм в пересчете на танин на приборе СФ-56. Результаты приведены в таблице 5.5.

Таблица 5.5

**Содержание дубильных веществ в образцах КИБ и МХИБ**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образцы | 96% спиртовое извлечение | 70% спиртовое извлечение | 40% спиртовое извлечение | 20% спиртовое извлечение | Водное извлечение | Содержание дубильных веществ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| КИБ | 1,75±0,09 | 0,34±0,02 | 0,25±0,01 | 0,11±0,01 | 0,07±0,004 | 2,52±0,13 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| МХИБ | 3,75±0,19 | 0,84±0,04 | 0,44±0,02 | 0,23±0,01 | 0,14±0,01 | 5,40±0,27 |

Исследование содержания дубильных веществ позволило установить, что механохимическая активация приводит к увеличению выхода дубильных веществ в 2 раза по сравнению с классическим измельчением бересты (табл. 5.5).

Для определения количественного содержания дубильных веществ использовались 2 методики: фармакопейная [41] и прямой спектрофотометрии (2.8.4.2).

Выявлено, что применение данных методов дает приблизительно одинаковые показатели содержания дубильных веществ в водном извлечении, полученном из образца КИБ (табл. 5.6).

При исследовании содержания данной группы веществ в водном извлечении (рис. 5.6, 5.7, 5.8) из МХИБ установлено, что показатели в данном случае различаются почти в 2 раза. Возможно, это связано с увеличением содержания оптически активных веществ в МХИБ, извлекающихся водой.

Таблица 5.6

**Содержание дубильных веществ в водных извлечениях, полученных из образцов КИБ и МХИБ**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образцы | Метод | |
|---|---|---|
| | Титриметрический | Спектрофотометрический |
| КИБ | 0,65±0,03 | 0,73±0,04 |
| МХИБ | 2,10±0,11 | 3,86±0,19 |

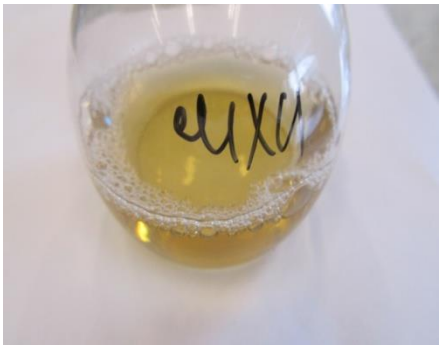



**Рисунок 5.6.** Фотография водного извлечения из образца МХИБ, оттитрованный 0,02 моль/л раствором калия перманганата

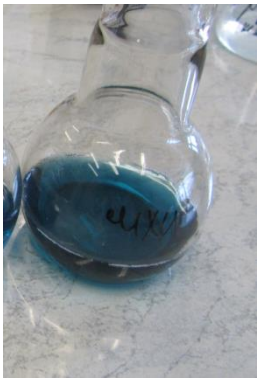



**Рисунок 5.7.** Фотография водного извлечения из образца МХИБ с индикатором - индигосульфокислота

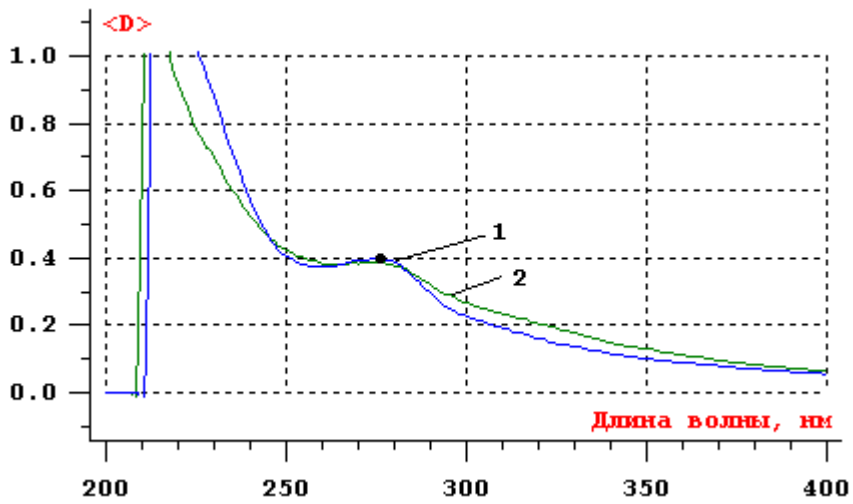



**Рисунок 5.8.** Спектры поглощения водных извлечений из образцов КИБ (2) и МХИБ (1)

Исследовано влияние экстрагента (96%, 80%, 70%, 40%, 20% спирта этилового и воды очищенной) на выход дубильных веществ из КИБ и МХИБ. Установлено, что наилучшим экстрагентом является 80% спирт этиловый, причем максимальный выход данной группы веществ составил из образца МХИБ (5,07%) (табл. 5.7).

Таблица 5.7

**Результаты определения влияния экстрагента на выход дубильных веществ из образцов КИБ и МХИБ**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Экстрагент | Образцы | |
|---|---|---|
| | КИБ | МХИБ |
| | Содержание дубильных веществ ( в пересчете на танин) | |
| Вода очищенная | 0,76±0,04 | 3,71±0,19 |
| 20% этанол | 1,17±0,06 | 4,01±0,20 |
| 40% этанол | 1,37±0,07 | 4,46±0,22 |
| 70% этанол | 2,12±0,11 | 4,56±0,23 |
| 80% этанол | 3,07±0,15 | 5,07±0,25 |
| 96% этанол | 2,53±0,13 | 4,93±0,25 |

Таким образом, механохимическая активация приводит к значительному увеличению выхода дубильных веществ из бересты, и наибольшее их количество извлекается 80% спиртом этиловым.

### 5.2.4. Гидроксикоричные кислоты

***Анализ качественного состава***

Для сравнительного хроматографического анализа гидроксикоричных кислот получены извлечения из образцов КИБ и МХИБ по методике: около 1,0 г

сырья образцов КИБ и МХИБ помещали в колбу с обратным холодильником и экстрагировали последовательно 96%, 70% спиртом этиловым при соотношении сырье - экстрагент 1:30 на водяной бане в течение 30 мин с момента закипания экстрагента. Извлечения в горячем виде фильтровали через бумажный фильтр, который возвращали в колбу с сырьем. Экстракцию проводили трижды для каждого экстрагента. Полученные 96% и 70% спиртовые извлечения объединяли и концентрировали отгонкой растворителя, далее проводили хроматографическое исследование.

По результатам хроматографического анализа (восходящая хроматография) установлено в образце КИБ наличие 6 веществ, в МХИБ – 15 веществ, из которых идентифицированы кислота хлорогеновая и кислота феруловая. Следует отметить, что образцы схожи по 5 веществам (рис. 5.9, 5.10 (см. в прил.), табл. 5.8).

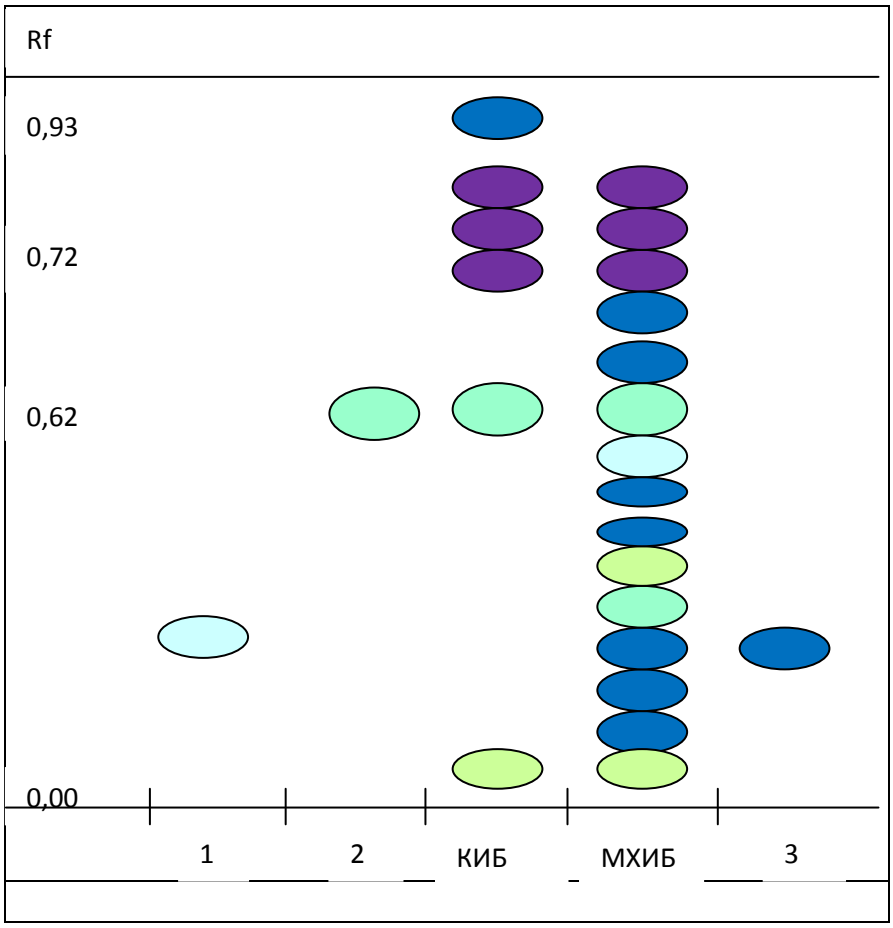



**Рисунок 5.9.** Схема хроматограммы при исследовании гидроксикоричных кислот образцов КИБ и МХИБ методом бумажной хроматографии

*Примечания. Условия хроматографии:* бумага «Filtrak» FN3, система растворителей: 2% водный раствор кислоты уксусной.

*Обозначения:* КИБ – береста, классически измельченная; МХИБ – береста, механохимически активированная; СОВС 1 – кислота кофейная, 2 – кислота хлорогеновая, 3 – кислота феруловая.

Таблица 5.8

**Результаты хроматографического исследования гидроксикоричных кислот в образцах КИБ и МХИБ**

| Система | Вещество | Rf | Свечение в УФ - свете | | Окраска пятен после реакции азосочетания | Образцы | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | До | После | | | |
| | | | обработки 5% спиртовым раствором NaOH | | | КИБ | МХИБ |
| **2% раствор кислоты уксусной** | Не идентифицировано | 0,08 | желто-зеленое | желто-зеленое | розовое | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,20 | желтое | синее | розово-коричневое | - | + |
| | Не идентифицировано | 0,25 | голубое | синее | розовое | - | + |
| | Кислота феруловая | 0,31 | синее | синее | оранжевое | - | + |
| | Не идентифицировано | 0,33 | голубое | зелено-синее | оранжевое | - | + |
| | Не идентифицировано | 0,36 | | желто-голубое | розово-коричневое | - | + |
| | Не идентифицировано | 0,40 | | синее | оранжевое | - | + |
| | Не идентифицировано | 0,46 | | синее | оранжевое | - | + |
| | Не идентифицировано | 0,54 | | голубое | розовое | - | + |
| | Кислота хлорогеновая | 0,62 | синее | зелено-голубое | оранжевое | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,65 | синее | синее | оранжевое | - | + |
| | Не идентифицировано | 0,69 | синее | синее | оранжевое | - | + |
| | Не идентифицировано | 0,72 | фиолетовое | фиолетовое | розово-коричневое | + | + |
| | Не | 0,80 | синее | фиолет | оранжевое | + | + |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | идентифицировано | | | овое | | | |
| | Не идентифицировано | 0,86 | фиолетовое | фиолетовое | розовое | + | + |
| | Не идентифицировано | 0,93 | синее | синее | оранжевое | + | - |

*Примечания.* Условия хроматографии: бумага «Filtrak» FN3, система растворителей: 2% водный раствор кислоты уксусной.

Полученное суммарное извлечение для анализа гидроксикоричных кислот нанесли в 4-х кратной повторности на хроматографическую бумагу «Filtrak» FN3. Хроматограмму поместили в хроматографическую камеру, насыщенную системой: 2% раствор кислоты уксусной. После прохождения растворителя не менее 25 см хроматограмму вынули, высушили и просмотрели в УФ - свете. Одну из 4-х хроматограмм проявили хромогенными реактивами (пары аммиака, 5% раствор натрия гидроксида в 95% спирте этиловом). Отметили границы пятен веществ исследуемой группы с Rf = 0,08; 0,25; 0,31; 0,62; 0,80; 0,86, которые при визуальной оценке хроматограмм в УФ - свете отличались наибольшей площадью пятна и наибольшей интенсивностью свечения. Отмеченные на трех хроматограммах вещества (в трех повторностях) вырезали, измельчали и каждую повторность отдельно элюировали горячим 70% спиртом этиловым. Элюаты охлаждали до комнатной температуры и снимали спектры в УФ области.

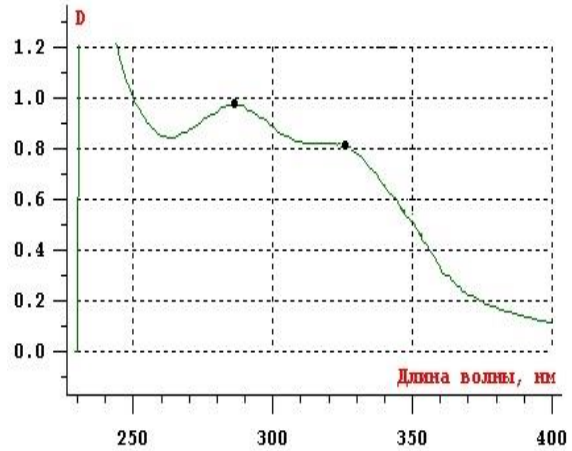



**Рисунок 5.11.** Спектр поглощения элюата (Rf=0,08).

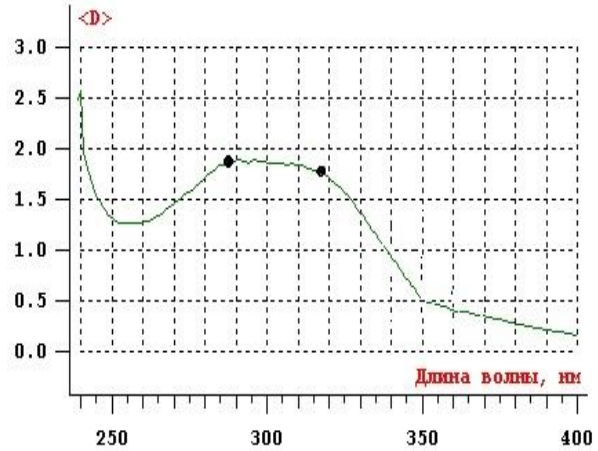



**Рисунок 5.12.** Спектр поглощения элюата (Rf=0,25).

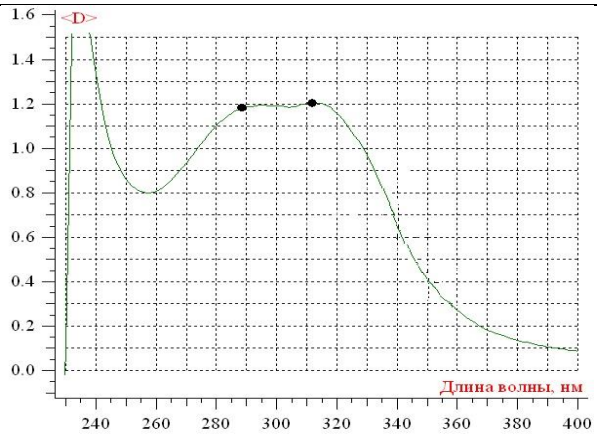



**Рисунок 5.13.** Спектр поглощения элюата
(Rf = 0,31).

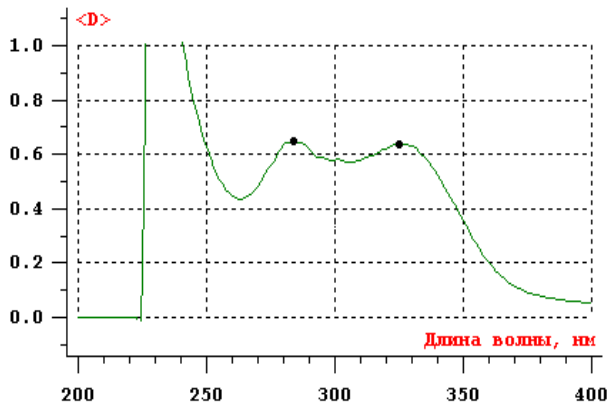



**Рисунок 5.14.** Спектр поглощения элюата (Rf = 0,62).

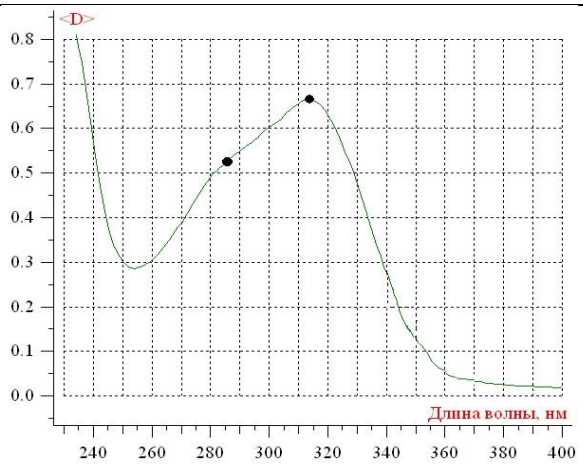



**Рисунок 5.15.** Спектр поглощения элюата
(Rf = 0,80).

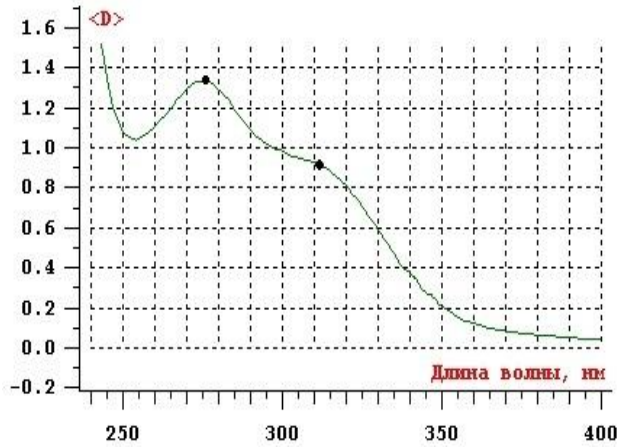



**Рисунок 5.16.** Спектр поглощения элюата (Rf = 0,86).


**Рисунок 5.17.** Спектр поглощения РСО – кислота феруловая

В МХИБ кроме кислоты хлорогеновой, идентифицирована и кислота феруловая (Rf = 0,31). Присутствие кислоты феруловой подтвердили совпадением УФ – спектров стандартного образца (рис. 5.17) и анализируемого вещества (рис. 5.13) и результатами ВЭЖХ (методика в п.2.3.3.).

Анализ проводили в автоматическом режиме по заданной программе. Вещество идентифицировали по времени удерживания в сравнении со стандартным образцом – кислотой феруловой. Анализируемое вещество идентифицировали как кислота феруловая ($t_R$ =20,708) (рис. 5.18, 5.19).

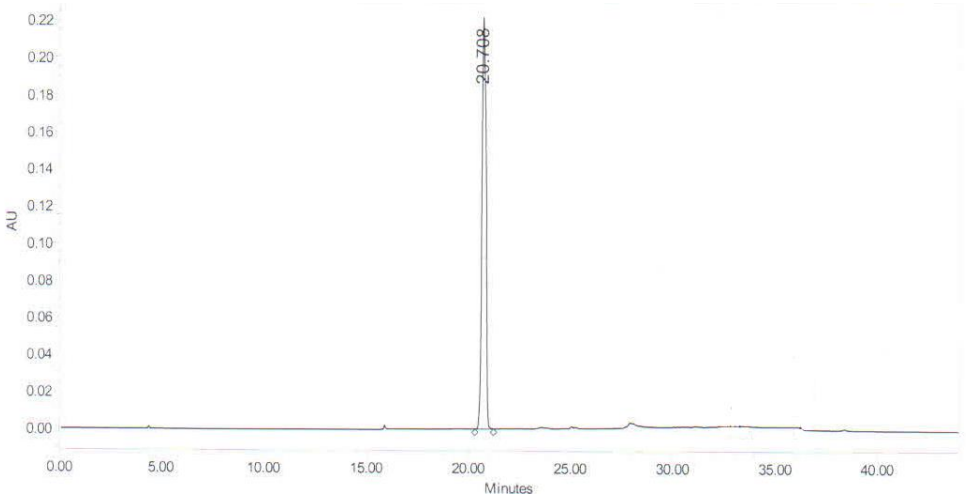



**Рисунок 5.18.** Хроматограмма стандартного вещества – кислоты феруловой

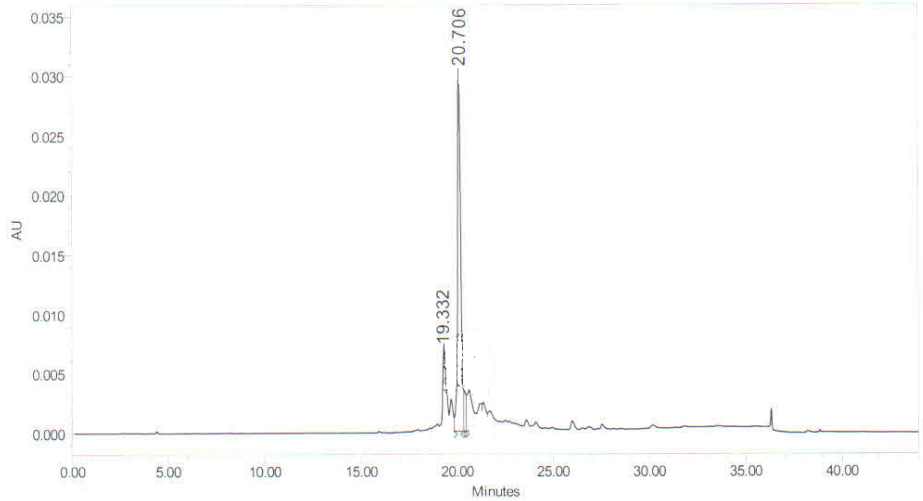



**Рисунок 5.19.** Хроматограмма элюата ($t_R$ =20,706)

Методом двумерной восходящей хроматографии в образце МХИБ установлено присутствие 28 веществ, в КИБ – 6 веществ. Результаты представлены на рисунке 5.20, 5. 21 (см. в прил.), таблицах 5.9 и 5.10.

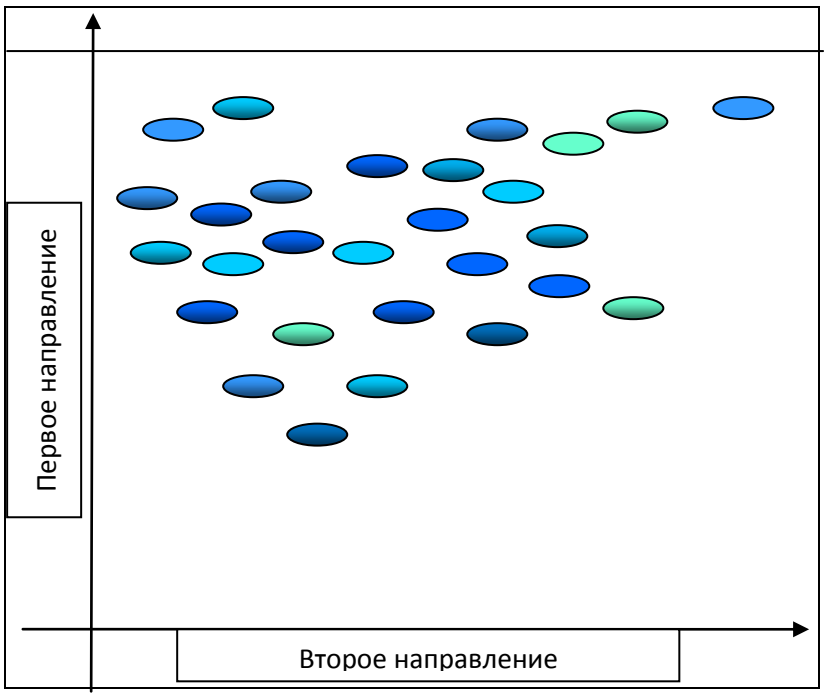



**Рисунок 5.20.** Схема хроматограммы при исследовании гидроксикоричных кислот образца МХИБ

*Условия хроматографии:* бумага «Filtrak» FN3, система растворителей: 1 направление - 2% водный раствор кислоты уксусной, 2 направление – БУВ (4:1:2).

Таблица 5.9

**Результаты исследования гидроксикоричных кислот образца МХИБ методом двумерной восходящей хроматографии**

| № | Вещество | Условия хроматографии «Filtrak» FN3, Rf | |
|---|---|---|---|
| | | 2% раствор $CH_3COOH$ | БУВ (4:1:2) |
| 1 | Не идентифицировано | 0,80 | 0,51 |
| 2 | Не идентифицировано | 0,71 | 0,56 |
| 3 | Не идентифицировано | 0,76 | 0,61 |
| 4 | Не идентифицировано | 0,85 | 0,71 |
| 5 | Не идентифицировано | 0,61 | 0,51 |
| 6 | Не идентифицировано | 0,64 | 0,55 |
| 7 | Не идентифицировано | 0,69 | 0,65 |
| 8 | Не идентифицировано | 0,76 | 0,71 |
| 9 | Не идентифицировано | 0,86 | 0,83 |
| 10 | Не идентифицировано | 0,30 | 0,43 |
| 11 | Не идентифицировано | 0,40 | 0,46 |
| 12 | Не идентифицировано | 0,59 | 0,61 |
| 13 | Не идентифицировано | 0,34 | 0,65 |
| 14 | Не идентифицировано | 0,54 | 0,72 |
| 15 | **Кислота хлорогеновая** | **0,62** | **0,77** |
| 16 | Не идентифицировано | 0,69 | 0,81 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 17 | Не идентифицировано | 0,75 | 0,83 |
| 18 | Не идентифицировано | 0,79 | 0,88 |
| 19 | Не идентифицировано | 0,18 | 0,66 |
| 20 | **Кислота феруловая** | **0,31** | **0,72** |
| 21 | Не идентифицировано | 0,37 | 0,77 |
| 22 | Не идентифицировано | 0,49 | 0,81 |
| 23 | Не идентифицировано | 0,33 | 0,91 |
| 24 | Не идентифицировано | 0,43 | 0,94 |
| 25 | Не идентифицировано | 0,004 | 0,95 |
| 26 | Не идентифицировано | 0,74 | 0,67 |
| 27 | Не идентифицировано | 0,80 | 0,80 |
| 28 | Не идентифицировано | 0,85 | 0,57 |

Таблица 5.10

**Результаты исследования гидроксикоричных кислот образца КИБ методом двумерной восходящей хроматографии**

| № | Вещество | Условия хроматографии | |
|---|---|---|---|
| | | «Filtrak» FN3, Rf | |
| | | 2% раствор $CH_3COOH$ | БУВ (4:1:2) |
| 1 | Не идентифицировано | 0,02 | 0,41 |
| 2 | Не идентифицировано | 0,03 | 0,57 |
| 3 | Не идентифицировано | 0,11 | 0,71 |
| 4 | Не идентифицировано | 0,73 | 0,78 |
| 5 | **Кислота хлорогеновая** | 0,62 | 0,77 |
| 6. | Не идентифицировано | 0,85 | 0,57 |

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии механохимической активации на компонентный состав гидроксикоричных кислот. Установлено наличие 28 веществ в образце МХИБ и 6 веществ в КИБ.

### *Анализ количественного содержания*

На основании ранее проведенных исследований (БХ) установлено, что преобладающим компонентом является кислота хлорогеновая, что подтверждается наибольшей площадью пятна вещества, интенсивностью его свечения в УФ – свете и окраске в видимом свете.

Расчет количественного содержания суммы гидроксикоричных кислот проводили в пересчете на кислоту хлорогеновую при длине волны 326±2 нм. Извлечения получали по схеме, приведенной в п. 2.8.2.

Установлено, что механохимическая активация приводит к увеличению выхода гидроксикоричных кислот на 0,7% (табл. 5.11).

Таблица 5.11

**Содержание гидроксикоричных кислот в образцах КИБ и МХИБ**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образцы | 96% спиртовое извлечение | 70% спиртовое извлечение | Содержание гидроксикоричных кислот |
|---|---|---|---|
| КИБ | 0,89±0,04 | 0,16±0,01 | 1,05±0,02 |
| МХИБ | 1,61±0,03 | 0,24±0,01 | 1,85±0,03 |

Исследование влияния экстрагента (спирт этиловый, водно-спиртовые смеси с содержанием спирта этилового 20, 40, 70, 80%, вода очищенная) на выход гидроксикоричных кислот из образцов КИБ и МХИБ показало, что на наибольший выход данной группы веществ наблюдается при использовании 80% спирта этилового из образца КИБ (1,33%) и 96% спирта этилового из МХИБ (1,97%). Результаты приведены в таблице 5.12.

Таблица 5.12

**Результаты определения влияния экстрагента на выход гидроксикоричных кислот из образцов КИБ и МХИБ**

| Экстрагент | Образцы | |
|---|---|---|
| | КИБ | МХИБ |
| | Содержание гидроксикоричных кислот ( в пересчете на кислоту хлорогеновую) | |
| Вода очищенная | 0,16±0,01 | 0,89±0,04 |
| 20% спирт этиловый | 0,21±0,01 | 1,17±0,02 |
| 40% спирт этиловый | 0,22±0,01 | 1,26±0,02 |
| 70% спирт этиловый | 0,98±0,05 | 1,49±0,03 |
| 80% спирт этиловый | 1,33±0,04 | 1,64±0,04 |
| 96% спирт этиловый | 1,31±0,03 | 1,97±0,01 |

Таким образом, механохимическая активация бересты приводит к изменению компонентного состава гидроксикоричных кислот и к увеличению их выхода на 0,7% по сравнению с классическим измельчением.

### 5.2.5. Аминокислоты

***Анализ качественного состава***

Проведен хроматографический анализ суммарных извлечений, полученных из образцов КИБ и МХИБ. Установлено, что в образце КИБ присутствуют 8 аминокислот аналогичных аминокислотам образцов бересты №№2 и 5. В образце МХИБ обнаружено 10, среди них незаменимые аминокислоты: фенилаланин, триптофан, лейцин, валин и аминокислоты, которые синтезируются в печени человека: орнитин, аланин, серин, пролин, глутаминовая кислота, глутамин (табл.5.13, рис. 5.22 (см.в прил).

Таблица 5.13

**Результаты хроматографического анализа состава аминокислот в образцах КИБ и МХИБ**

| № | Rf | Вещество | Обработка 0,2% спиртовым раствором нингидрина | Образцы | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | КИБ | МХИБ |
| 1 | 0,02 | Орнитин | розово-фиолетовое | + | + |
| 2 | 0,05 | Пролин | желтое | + | + |
| 3 | 0,07 | Лизин | фиолетовое | + | - |
| 4 | 0,1 | Серин | сиреневое | - | + |
| 6 | 0,14 | Аспарагиновая кислота | розовое | + | - |
| 7 | 0,18 | Глутамин | фиолетовое | - | + |
| 8 | 0,22 | Глутаминовая кислота | сиреневое | + | + |
| 9 | 0,27 | Треонин | фиолетовое | + | - |
| 10 | 0,33 | Аланин | фиолетовое | + | + |
| 12 | 0,42 | Триптофан | розовый | + | + |
| 14 | 0,48 | Валин | розовый | - | + |
| 15 | 0,62 | Фенилаланин | розовый | - | + |
| 16 | 0,69 | Лейцин | розовое | - | + |

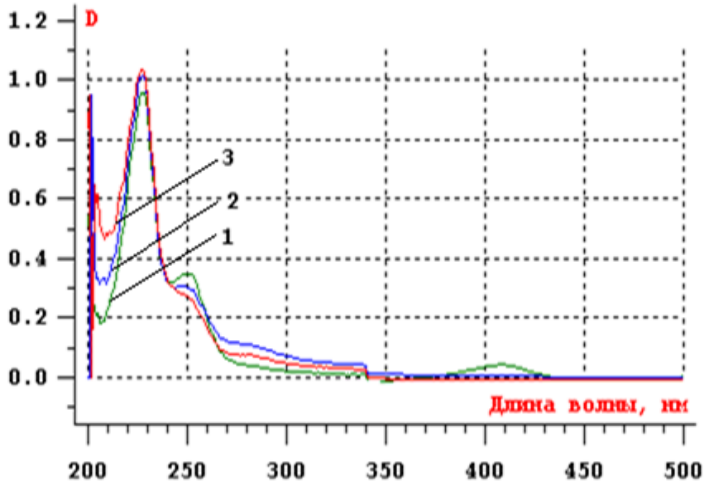



**Рисунок 5.23.** Электронные спектры поглощения продуктов взаимодействия α – аминокислот с 0,2% спиртовым раствором нингидрина (1 - СОВС – аланин в 96% этаноле, 2 – образец МХИБ (96% спиртовое извлечение), 3 - образец КИБ (96% спиртовые извлечения)

На основании проведенного сравнительного хроматографического исследования аминокислотного состава видно, что образцы КИБ и МХИБ схожи по 5 аминокислотам: орнитин, пролин, глутаминовая кислота, аланин и триптофан (табл. 5.13).

Преобладающим компонентом в сумме аминокислот является аланин, это подтверждается результатами сравнительного хроматографического исследования аминокислот (рис. 5.22 (см.в прил.) и совпадением рисунка спектров поглощения продуктов взаимодействия суммы аминокислот, содержащихся в извлечениях, полученных из исследуемых образцов и индивидуальной аминокислоты – аланина с 0,2% раствором нингидрина (рис. 5.23). Поэтому при анализе количественного содержания суммы аминокислот в извлечениях расчет количественного содержания проводили в пересчете на аланин.

### *Анализ количественного содержания*

Определено содержание аминокислот в извлечениях образцов КИБ и МХИБ, полученных по методике - п.2.8.5. Установлено, что в образце КИБ содержится 2,62%, в образце МХИБ – 2,48% (табл. 5.14).

Таблица 5.14

**Содержание аминокислот в образцах КИБ и МХИБ**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Образцы | 96% спиртовое извлечение | 70% спиртовое извлечение | 40% спиртовое извлечение | 20% спиртовое извлечение | Водное извлечение | Содержание аминокислот |
|---|---|---|---|---|---|---|
| КИБ | 0,86±0,04 | 0,46±0,02 | 0,29±0,01 | 0,52±0,03 | 0,49±0,02 | 2,62±0,13 |
| МХИБ | 0,77±0,04 | 0,74±0,04 | 0,32±0,02 | 0,26±0,01 | 0,39±0,02 | 2,48±0,12 |

Следующим этапом было определение оптимального экстрагента для извлечения аминокислот из образцов КИБ и МХИБ.

Для анализа использовали следующие экстрагенты: 96%, 80%, 70%, 40%, 20% спирт этиловый и вода очищенная.

Полученные результаты позволили установить, что наилучшими экстрагентами для извлечения аминокислот из образца МХИБ являются 20% спирт этиловый (2,74%) и вода очищенная (2,63%), из КИБ – вода очищенная (2,72%). Результаты приведены в таблице 5.15.

Таблица 5.15

**Результаты определения влияния экстрагента на выход аминокислот из образцов КИБ и МХИБ**

| Экстрагент | Образцы | |
|---|---|---|
| | КИБ | МХИБ |
| | Содержание аминокислот | |

| | (в пересчете на аланин) | |
|---|---|---|
| Вода очищенная | 2,72±0,14 | 2,63±0,13 |
| 20% спирт этиловый | 1,79±0,09 | 2,74±0,14 |
| 40% спирт этиловый | 1,68±0,08 | 1,69±0,08 |
| 70% спирт этиловый | 1,99±0,10 | 1,81±0,09 |
| 80% спирт этиловый | 1,89±0,09 | 1,57±0,08 |
| 96% спирт этиловый | 1,87±0,09 | 1,51±0,08 |

Таким образом, механохимическая активация влияет на компонентный состав аминокислот, в образце МХИБ обнаружено 10 веществ, в КИБ - 8 веществ. Выявлено, что исследуемые образцы схожи по 5 аминокислотам: орнитин, пролин, глутаминовая кислота, аланин и триптофан. При этом выход данной группы веществ практически не изменяется. Оптимальными экстрагентами для извлечения аминокислот из образца КИБ являются 20% спирт этиловый и вода очищенная.

### 5.2.6. Исследование элементного состава

Анализ элементного состава образцов КИБ и МХИБ показал присутствие 61-го элемента. Все исследуемые образцы по компонентному составу различий не имеют (табл. 5.16).

Таблица 5.16

**Элементный состав образцов КИБ и МХИБ**

**(в мкг/г на воздушно сухое сырье)**

| Элемент | Образцы | | Элемент | Образцы | | Элемент | Образцы | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | КИБ | МХИБ | | КИБ | МХИБ | | КИБ | МХИБ |
| Li | 0,022 | 0,44 | As | <0,0005 | <0,0005 | Eu | 0,0001 | 0,0052 |
| Be | <0,001 | <0,001 | Se | 0,16 | 0,49 | Gd | 0,0015 | 0,022 |
| B | 1,53 | 12,5 | Br | 1,01 | 0,76 | Tb | 0,0003 | 0,0039 |
| Na | 47,6 | 361,0 | Rb | 0,20 | 1,67 | Dy | 0,0013 | 0,014 |
| Mg | 171,0 | 660,0 | Sr | 2,30 | 34,3 | Ho | 0,0003 | 0,0035 |
| Al | 21,7 | 249,01 | Y | 0,011 | 0,098 | Er | 0,0002 | 0,0075 |
| Si | 164,0 | 197,0 | Zr | 0,060 | 0,36 | Tm | 0,0002 | 0,0012 |
| P | 70,5 | 492,0 | Nb | 0,0038 | 0,045 | Yb | 0,0002 | 0,0063 |
| K | 332,0 | 1984,0 | Mo | 0,031 | 0,51 | Lu | 0,0001 | 0,001 |
| Ca | 239,0 | 5750,0 | Ag | 0,014 | 0,020 | Hf | 0,0011 | 0,0082 |
| Ti | 1,53 | 16,6 | Cd | 0,12 | 0,33 | Ta | 0,0014 | 0,0072 |
| V | 0,077 | 0,50 | Sn | 0,23 | 2,75 | W | 0,0037 | 2,11 |
| Cr | 1,81 | 73,8 | Sb | 0,010 | 0,27 | Au | 0,0011 | 0,0014 |
| Mn | 142,0 | 141,0 | I | 0,14 | 0,091 | Hg | 0,0068 | 0,0091 |
| Fe | 19,2 | 757,0 | Cs | 0,0029 | 0,064 | Tl | 0,0006 | 0,0087 |
| Co | 0,033 | 0,59 | Ba | 5,75 | 40,3 | Pb | 0,10 | 1,20 |
| Ni | 0,96 | 19,0 | La | 0,019 | 0,14 | Bi | 0,053 | 0,67 |
| Cu | 6,93 | 5,36 | Ce | 0,027 | 0,26 | Th | 0,0033 | 0,028 |
| Zn | 52,1 | 69,5 | Pr | 0,0028 | 0,029 | U | 0,0011 | 0,0080 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ga | 0,049 | 0,42 | Nd | 0,010 | 0,11 | | | |
| Ge | 0,0037 | 0,056 | Sm | 0,0011 | 0,025 | | | |

Примечание: в таблице приведены средние значения 5 измерений

При сравнительном анализе исследуемых образцов бересты выявлено, что механохимическая обработка приводит к изменениям в содержании элементов. Содержание одних элементов (Si, Zn, Ag, Au, Hg) увеличивается незначительно (не более чем в 1,4 раза), содержание других элементов (B, Na, Mg, P, K, V, Ga, Se, Rb, Y, Zr, Cd, Ba, La, Ce, Pr, Tm, Hf, Ta, Th, U, Lu) увеличивается в 3-10 раз; увеличение содержания в 11-20 раз отмечено для Li, Al, Ti, Co, Ni, Ge, Sr, Nb, Mo, Sn, Nd, Gd, Tb, Dy, Ho, Tl, Pb, Bi; содержание следующей группы элементов увеличивается в 20-50 раз: Cs (×22), Sm (×23), Ca (×24), Sb (×27), Yb (×31), Er (×37), Fe (×39), Cr (×41), Eu (×52); содержание W увеличивается в 570 раз. На ряд элементов (Be, Mn, As) механохимическая обработка не оказала влияния, их содержание не различается в исследуемых образцах бересты. Содержание ряда элементов (Cu, Br, I) при механохимической активации бересты незначительно снижается.

## Выводы по главе 5

1. По результатам сравнительного общего фитохимического анализа установлено, что образцы бересты МХИБ и КИБ по составу основных групп БАВ (тритерпеновые сапонины, полифенольные окисляемые (дубильные) вещества, гидроксикоричные кислоты, кумарины, аминокислоты) различий не имеют.
2. Механохимическая активация бересты приводит к изменению компонентного состава кумаринов, гидроксикоричных кислот, аминокислот.
3. Механохимическая активация бересты приводит к увеличению выхода большинства групп БАВ: тритерпеновых сапонинов, кумаринов, дубильных веществ, гидроксикоричных кислот, при этом выход аминокислот практически не изменяется.
4. Оптимальными экстрагентоми для извлечения из образца МХИБ дубильных веществ и гидроксикоричных кислот является 80% спирт этиловый, аминокислот – 20% спирт этиловый и вода очищенная.
5. При механохимической активации бересты происходит изменение содержания отдельных элементов при неизменности их состава.

# ГЛАВА 6
# УСТАНОВЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОДЛИННОСТИ И КАЧЕСТВА ОБРАЗЦОВ КИБ И МХИБ

## 6.1. Установление показателей подлинности

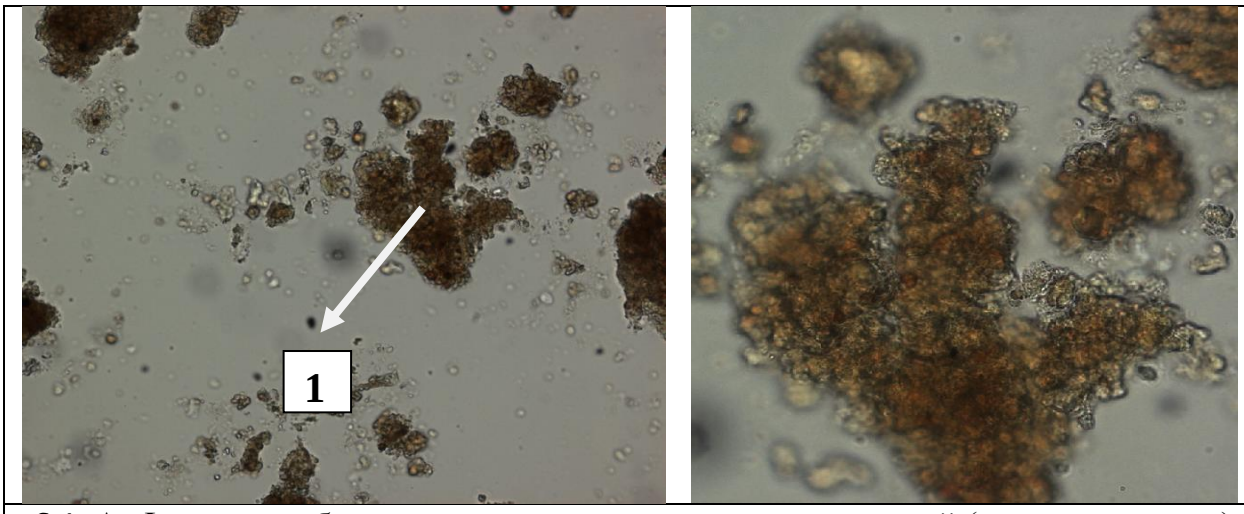
### 6.1.1. Морфометрические диагностические признаки сырья – МХИБ

Описание внешних признаков цельного и измельченного сырья КИБ приведены в пункте 4.1.3.

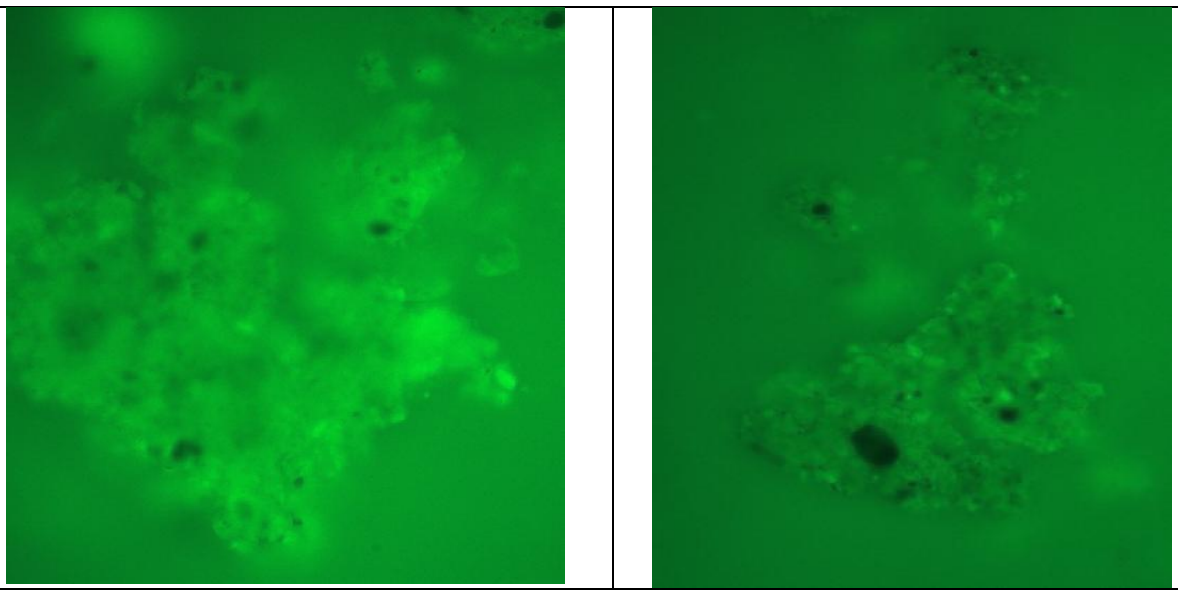
Образец бересты, подвергнутый механохимической активации представляет собой плотный темно-коричневый порошок с преобладанием фракции с размером частиц - 0,315 мм, со слабым запахом и вяжущим вкусом.

### 6.1.2. Микродиагностические признаки сырья – МХИБ

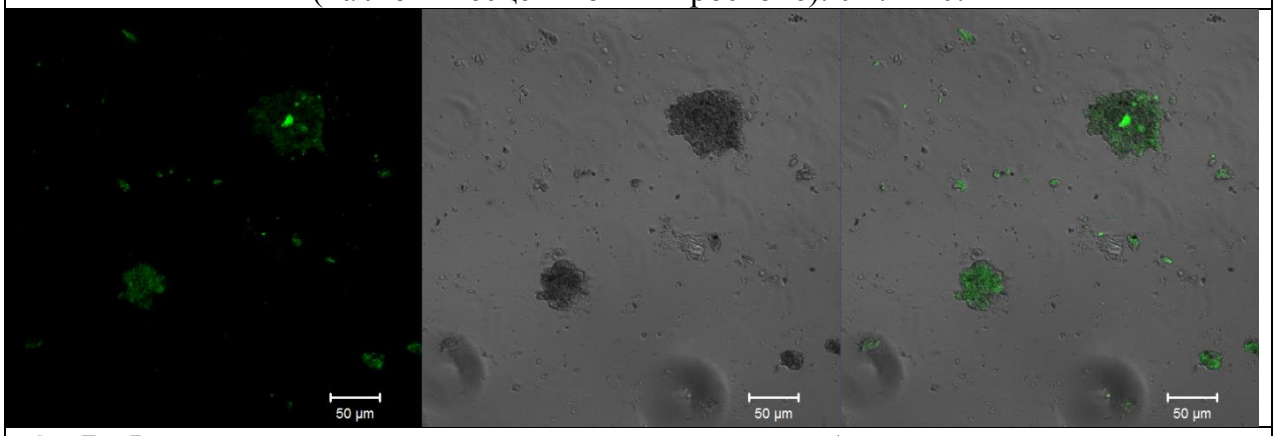
При механохимической активации происходит разрушение клеточных стенок, поэтому при микроскопическом исследовании наблюдаются бесформенные глыбки пробковой ткани (рис. 6.1 – А, В). При исследовании препаратов в УФ - свете наблюдается отсутствие клеточной структуры – свечение характерно для всей массы, наблюдаемой в микроскоп (рис. 6. 1 – Б, В).




**6.1. А.** Фрагменты бересты механохимически активированной (в видимом свете). 1 – глыбки пробковой ткани. Ув. х 40.



**6.1.Б.** Фрагменты бересты механохимически активированной (на люминесцентном микроскопе). Ув. х 40.




**6.1.В.** Фрагменты механохимически активированной бересты в видимом свете и в УФ свете. Ув. х 20.

Сравнительный анализ микроскопии КИБ и МХИБ показал, что клеточные структуры как в цельном виде, так и в разрушенном обладают автофлуоресценцией, что может связано с наличием БАВ, способных флуоресцировать в УФ свете и сохраняться при механохимической активации.

### 6.1.3. Качественные фитохимические реакции на основные группы БАВ

Качественный анализ сырья МХИБ проводят аналогично качественному анализу КИБ (п. 4.1.5.).

## 6.2. Установление показателей качества

Стандартизация сырья МХИБ проводится по содержанию основных групп БАВ: тритерпеновым сапонинам и дубильным веществам согласно методикам, приведенным в пункте 4.2.1 и 4.2.2.

Содержание тритерпеновых сапонинов в МХИБ должно быть не менее 40%, содержание дубильных веществ – не менее 3%.

### 6.2.1. Определение товароведческих показателей КИБ и МХИБ

Установлены показатели влажности и золы общей в исследуемых образцах (табл. 6.1).

Таблица 6.1

**Товароведческие показатели образцов КИБ и МХИБ**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Показатели | **КИБ** | **МХИБ** |
|---|---|---|
| | Содержание, % | |
| **Влажность** | 2,65±0,13 | 2,10±0,11 |
| **Зола общая** | 0,77±0,04 | 1,58±0,08 |

Таким образом, показатель влажности в образцах КИБ и МХИБ не превышает 3%. Содержание золы общей в образце МХИБ в 2 раза больше, чем в образце КИБ.

***Экстрактивные вещества***

Для проведения анализа были использованы экстрагенты: 96%, 80%, 70%, 40%, 20%, 10% спирт этиловый и вода очищенная.

Установлено, что наилучшим экстрагентом является 80% спирт этиловый. Эктрактивные вещества (сухой остаток) для образца МХИБ составил 36,85%, а для образца КИБ - 30,96%. При этом из МХИБ экстрагировалось водой в 3 раза больше веществ (7,6%), чем из КИБ (2,36%). Результаты приведены в таблице 6.2.

Таблица 6.2

**Содержание экстрактивных веществ КИБ и МХИБ**

(в %, в пересчете на абсолютно-сухое сырье)

| Экстрагент | Образцы | |
|---|---|---|
| | КИБ | МХИБ |
| Вода | 2,36±0,12 | 7,6±0,38 |
| 10% спирт этиловый | 2,76±0,14 | 7,2±0,36 |
| 20% спирт этиловый | 4,10±0,21 | 7,22±0,36 |
| 40% спирт этиловый | 5,17±0,26 | 9,03±0,45 |
| 70% спирт этиловый | 28,29±1,41 | 29,91±1,50 |
| 80% спирт этиловый | 30,96±1,55 | 36,85±1,84 |
| 96% спирт этиловый | 29,90±1,50 | 34,84±1,74 |

## Ситовой анализ измельченной бересты

При ситовом анализе образца МХИБ были выявлены фракции с размером частиц: 1; 0,7; 0,5; 0,315 и 0,1 мм. Результаты представлены в таблице 6.3.

Таблица 6.3

**Фракционный состав образца МХИБ**

| Размер частиц, (мм) | Процентное соотношение, (%) |
|---|---|
| > 1 | 0,2±0,01 |
| 1 | 0,2±0,01 |
| 0,7 | 0,4±0,02 |
| 0,5 | 1,0±0,05 |
| 0,315 | 68,0±3,40 |
| 0,1 | 26,0±1,30 |
| <0,1 | 4,2±0,21 |

Установлено, что в образце бересты, подвергнутой механохимической активации, преобладает фракция с размером частицы 0,315 мм (составляет 68%).

## 6.3. Установление сроков хранения МХИБ

Установления срока годности МХИБ проводили по показателям, приведенным в таблице 6.4. Все измерения проводили в трехкратной повторности через определенные промежутки времени в течение 4 лет.

Установлено, что оптимальный срок хранения механохимически активированной бересты составляет 4 года.

Таблица 6.4

**Установление срока хранения МХИБ**

| Вид | Срок хранения | Условия хранения | Описание | Подлинность | Зола общая, % | Потеря в массе при высушивании, % | Тритерпеновых сапонинов, % | Дубильных веществ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| МХИБ | Исходно | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 1,58 | 2,10 | 43,22 | 3,76 |
| | 0,5 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 1,60 | 2,12 | 43,22 | 3,74 |
| | 1 год | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 1,57 | 2,09 | 43,19 | 3,72 |
| | 1,5 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 1,56 | 2,06 | 43,21 | 3,73 |
| | 2 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 1,58 | 2,07 | 43,20 | 3,71 |
| | 3 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 1,56 | 2,06 | 43,19 | 3,71 |
| | 3,5 | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 1,56 | 2,05 | 43,18 | 3,72 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | года | | | | | | | |
| | 4 года | Соотв. | Соотв. | Соотв. | 1,55 | 2,03 | 43,18 | 3,71 |

Таким образом, для бересты, подвергнутой механохимической активации, определены морфометрические и микродиагностические признаки. Установлены показатели качества сырья: содержание действующих веществ - тритерпеновые сапонины – не менее 40%, дубильные вещества – не менее 3%, влажность не более 3%, зола общая – не более 2%, процентное содержание фракции с размером частиц 0,315 мм не менее 60%. Определен предварительный срок хранения МХИБ - 4 года.

---

По результатам исследований ряда авторов показано, что экстракты, полученные из бересты, обладают широким спектром биологической активности [53, 54, 63, 72, 88, 144, 161, 164, 169, 186]. Данный факт многие исследователи связывают с преобладанием в составе экстрактов бересты тритерпенового спирта – бетулина.

Ранее проведенными исследованиями нами было установлено, что оптимальным экстрагентом для извлечения большинства групп БАВ является 80% спирт этиловый, особенно тритерпеновых сапонинов.

Представило интерес изучение качественного состава, количественного содержания БАВ и биологической активности экстрактов бересты, содержащих в своем составе вещества гидрофильной и липофильной природы. В качестве экстрагента мы использовали 20% спирт этиловый.

Таким образом, нами получены экстракты на 20% и 80% спирте этиловом.

# ГЛАВА 7
# ПОЛУЧЕНИЕ СУХИХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ БЕРЕСТЫ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

## 7.1. Подбор оптимальных технологических параметров для получения сухих экстрактов из бересты

Изучение влияния технологических параметров на процесс экстрагирования проводили на сырье – «Береста», измельченная классическим методом. В качестве экстрагента использовали 20% спирт этиловый.

Исследовали следующие технологические параметры: размер частиц сырья, соотношение сырья и экстрагента, кратность экстракции. Результаты приведены в таблице 7.1.

Таблица 7.1

**Результаты исследования оптимальных технологических параметров экстракции сырья – «Береста»**

| Параметры | Содержание, % | |
|---|---|---|
| | Дубильные вещества | Гидроксикоричные кислоты |
| **Размер частиц сырья, мм** | | |
| 7 | 0,24±0,01 | 0,04±0,002 |
| 5 | 0,28±0,01 | 0,05±0,003 |
| 3 | 0,41±0,02 | 0,08±0,004 |
| 2 | 0,56±0,03 | 0,13±0,01 |
| 1 | 0,68±0,03 | 0,15±0,01 |
| 0,7 | 0,72±0,04 | 0,17±0,01 |
| **0,5** | **0,84±0,04** | **0,19±0,01** |
| **Соотношение сырья и экстрагента** | | |
| 1:20 | 0,50±0,03 | 0,11±0,01 |
| 1:30 | 0,61±0,03 | 0,12±0,01 |
| 1:40 | 0,85±0,04 | 0,17±0,01 |
| 1:50 | 0,92±0,05 | 0,18±0,01 |
| 1:60 | 0,95±0,05 | 0,19±0,01 |
| 1:70 | 0,95±0,05 | 0,21± 0,01 |
| 1:80 | 0,97±0,05 | 0,21±0,01 |
| 1:90 | 1,03±0,05 | 0,22±0,01 |
| 1:100 | 1,04±0,05 | 0,23±0,01 |
| 1:110 | 0,92±0,05 | 0,17±0,01 |
| **1:120** | **1,08±0,05** | **0,24±0,01** |
| 1:130 | 0,82±0,04 | 0,14±0,01 |
| 1:140 | 0,77±0,04 | 0,13±0,01 |
| 1:150 | 0,75±0,04 | 0,13±0,01 |
| **Кратность экстракции** | | |
| 2 раза по 60 мл | 0,95±0,05 | 0,17±0,01 |
| 3 раза по 40 мл | 1,26±0,06 | 0,26±0,01 |

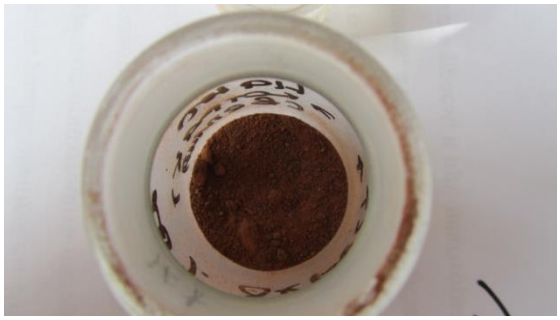
Анализ данных таблицы 7.1 позволил определить оптимальные технологические параметры для получения извлечения с наибольшим содержанием БАС из бересты: экстрагент – спирт этиловый 20%, размер частиц сырья – 3 мм, гидромодуль – 1 : 40, кратность экстракции – 3, продолжительность экстракции – 30 мин.

Таким образом, способ получения экстракта из бересты заключается в последовательной экстракции сырья с размером частиц 3 мм 20% спиртом этиловым при соотношении сырье – экстрагент 1:40, при температуре 90-92 ºС в течении 30 минут с момента закипания экстрагента. Далее извлечение фильтруют через фильтр, после чего фильтр возвращают обратно в колбу. Экстракцию

повторяют дважды в тех же условиях. Затем фильтраты объединяют, отгоняют спирт в роторном испарителе до сиропообразной консистенции и сушат.

Приведенная выше схема использовалась для получения экстракта из бересты с использованием 80% спирта этилового.

Таким образом нами получены сухие экстракты из КИБ и МХИБ на 20% и 80% спирте этиловом (рис. 7.1, 7.2, 7.3, 7.4).

| | |
|---|---|
| Экстракт из КИБ (экстрагент 20% спирт этиловый) – светлый порошок с приятным запахом, горьковатым и слегка вяжущим вкусом, растворим в воде (рис. 7.1).<br>  <br>**Рисунок 7.1.** КИБЭ20 | Экстракт из МХИБ (экстрагент 20% спирт этиловый) – порошок темно-коричневого цвета, с насыщенным приятным запахом, выраженным вяжущим и горьковатым вкусом, растворим в воде (рис. 7.2).<br>  <br>**Рисунок 7.2.** МХИБЭ20 |
| Экстракт из КИБ (экстрагент 80% спирт этиловый) – аморфный легкий порошок бежевого цвета со слабым запахом и вяжущего вкуса, не растворим в воде (рис. 7.3).<br>  <br>**Рисунок 7.3.** КИБЭ80 | Экстракт из МХИБ (экстрагент 80% спирт этиловый) – более аморфный легкий серый порошок с приятным запахом и вяжущим вкусом, не растворим в воде (рис. 7.4).<br>  <br>**Рисунок 7.4.** МХИБЭ80 |

Для стандартизации сухих экстрактов предложены методики подлинности и доброкачественности, описанные для сырья – «Береста».

Сухие экстракты, полученные на 80% спирте этиловом, предлагаем стандартизовать по содержанию тритерпеновых сапонинов и дубильных веществ.

Сухие экстракты, полученные на 20% спирте этиловом, предлагаем стандартизовать по группе дубильных веществ.

Основные параметры экстрактов бересты классически измельченной и механохимически активированной представлены в таблице 7.2, 7.3.

Таблица 7.2

**Товароведческие и числовые показатели сухих экстрактов из КИБ и МХИБ, полученных на 20% спирте этиловом**

| Показатели | Содержание КИБЭ20 | Содержание МХИБЭ20 |
|---|---|---|
| Дубильные вещества, % | 27,43±1,37 | 41,96±2,10 |
| Гидроксикоричные кислоты, % | 3,85±0,19 | 9,86±0,49 |
| Кумарины, % | 7,96±0,40 | 12,78±0,64 |
| Аминокислоты, % | 3,65±0,18 | 3,22±0,16 |
| Влажность, % | 3,71±0,19 | 3,42±0,17 |
| Зола общая, % | 4,97±0,25 | 6,25±0,31 |

Таблица 7.3

**Товароведческие и числовые показатели сухих экстрактов из КИБ и МХИБ, полученных на 80% спирте этиловом**

| Показатели | Содержание КИБЭ80 | Содержание МХИБЭ80 |
|---|---|---|
| Тритерпеновые сапонины, % | 45,76±2,29 | 62,91±3,15 |
| Дубильные вещества, % | 7,52±0,38 | 17,58±0,88 |
| Гидроксикоричные кислоты, % | 3,18±0,16 | 6,34±0,32 |
| Кумарины, % | 2,13±0,11 | 5,05±0,25 |
| Аминокислоты, % | 4,86±0,24 | 4,13±0,21 |
| Влажность, % | 1,09±0,05 | 2,51±0,13 |
| Зола общая, % | 0,14±0,01 | 1,17±0,06 |

Следующим этапом было исследование элементного состава сухих экстрактов.

Анализ элементного состава образцов бересты КИБ, МХИБ (табл. 5.16) и сухих экстрактов из них показал присутствие 61-го элемента (табл. 7.4, 7.5). Все исследуемые образцы по компонентному составу различий не имеют.

Сравнительный анализ количественного содержания элементов КИБ и КИБЭ20 показал, что экстракт значительно (в разы и даже порядки) превосходит по содержанию большинства элементов.

При сравнительном анализе образца МХИБ и МХИБЭ20 установлено, что по содержанию ряда элементов (Cu, Cd, Sb, Ba, Co, Zn, Si, Na) экстракт в 1,5-2,5 раза превосходит исходное сырье; в 3-8 раз увеличивается содержание U, P, Mg, Rb, K, Tl, B, Li, по содержанию только трех элементов экстракт значительно превосходит исходное сырье: Be (×15), Br (×29), I (×37). Содержание большей части элементов, таких как Al, Ti, Ni, Mo, Nb и другие (всего 36 элементов), в экстракте меньше, чем в исходном сырье (в 2-5 раз), для Cr, Fe, Ta отмечено снижение содержания в десятки раз (в 11-23 раза). Равное содержание в исходном сырье и экстракте отмечено для элементов: Ca, As, Sr, Ag, Au.

Сравнительный анализ экстрактов (на 20% спирте этиловом), полученных из КИБ и МХИБ, показал, что механохимическая активация сырья приводит к снижению содержания большей части элементов (39 элементов, таких как Al, Si, Cr, Mn, Fe, Zn, Br, Mo, Ag, Cd, Sn, Hg, Bi, Pb и др.), не влияет на содержание As, Au и увеличивает выход ряда элементов в разы: Li (×7,5), Be (×15), B (×1,5), P (×1,4), K (×2,2), Ca (×1,5), Co (×2,6), W (×2,3) и др.

Таблица 7.4

**Содержание элементов в сухих экстрактах бересты КИБ и МХИБ (экстрагент 20% спирт этиловый)**

(в мкг/г на воздушно сухое сырье)

| Элемент | Образцы | | Элемент | Образцы | | Элемент | Образцы | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | КИБЭ 20 | МХИБЭ 20 | | КИБЭ 20 | МХИБЭ 20 | | КИБЭ 20 | МХИБЭ 20 |
| Li | 0,46 | 3,47 | As | <0,0005 | <0,0005 | Eu | 0,0021 | 0,0006 |
| Be | <0,001 | 0,015 | Se | 0,64 | 0,84 | Gd | 0,012 | 0,0033 |
| B | 62,8 | 92,8 | Br | 48,0 | 21,7 | Tb | 0,0018 | 0,0006 |
| Na | 1470,0 | 860,0 | Rb | 3,36 | 8,87 | Dy | 0,0062 | 0,0030 |
| Mg | 1683,0 | 2549,0 | Sr | 21,0 | 35,9 | Ho | 0,0021 | 0,0005 |
| Al | 130,0 | 66,0 | Y | 0,062 | 0,023 | Er | 0,0041 | 0,0009 |
| Si | 530,0 | 398,0 | Zr | 0,36 | 0,16 | Tm | 0,0008 | 0,0004 |
| P | 1155,0 | 1586,0 | Nb | 0,026 | 0,0051 | Yb | 0,0036 | 0,001 |
| K | 4838,0 | 10675,0 | Mo | 0,15 | 0,11 | Lu | 0,0009 | 0,0005 |
| Ca | 3770,0 | 5712,0 | Ag | 0,091 | 0,024 | Hf | 0,0072 | 0,0017 |
| Ti | 15,0 | 2,74 | Cd | 0,46 | 0,21 | Ta | 0,0027 | 0,0006 |
| V | 0,84 | 0,20 | Sn | 1,37 | 0,45 | W | 0,080 | 0,18 |
| Cr | 4,35 | 3,28 | Sb | 1,32 | 0,49 | Au | 0,016 | 0,016 |
| Mn | 1140,0 | 563,0 | I | 12,5 | 3,32 | Hg | 0,030 | 0,0077 |
| Fe | 114,0 | 69,2 | Cs | 0,021 | 0,055 | Tl | 0,014 | 0,051 |
| Co | 0,44 | 1,19 | Ba | 42,0 | 48,2 | Pb | 17,3 | 0,98 |
| Ni | 4,84 | 5,32 | La | 0,099 | 0,026 | Bi | 1,54 | 0,3774 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cu | 28,8 | 7,07 | Ce | 0,14 | 0,040 | Th | 0,013 | 0,0038 |
| Zn | 388,0 | 148,0 | Pr | 0,017 | 0,0049 | U | 0,064 | 0,022 |
| Ga | 0,41 | 0,25 | Nd | 0,058 | 0,021 | | | |
| Ge | 0,0036 | 0,010 | Sm | 0,013 | 0,0078 | | | |

Примечание: в таблице приведены средние значения 5 измерений

Сравнительный анализ количественного содержания элементов КИБ и КИБЭ80 выявил, что в экстракте содержание большинства элементов меньше, чем в исходном сырье: Mg, Al, K, Co, Ni, Zn, Rb, Sr, V, Zr, Ag, Sn, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Dy, Tm, Hf, Th в 1,2 - 4 раза; Cu в 4,5 раза, Mn, Ga, Cd, Ta, Bi в 6-10 раз; значительно снижается содержание W (в 37 раз). При этом содержание ряда элементов в экстракте увеличивается (всего 22 элемента, таких как: Na, Li, B, P, Se, Br, Mo, Sb, I и др.). Равное содержание элементов в экстракте и сырье отмечено для Ti, Cs, Gd, Ca, V, Cr, Fe, Nb (табл. 5.16).

При сравнительном анализе количественного содержания элементов МХИБ и МХИБЭ80 выявлено, что в экстракте содержание большинства элементов значительно меньше, чем в исходном сырье.

Таблица 7.5

**Содержание элементов в сухих экстрактах бересты КИБ и МХИБ (экстрагент 80% спирт этиловый)**

(в мкг/г на воздушно сухое сырье)

| Элемент | Образцы | | Элемент | Образцы | | Элемент | Образцы | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | КИБЭ 80 | МХИБЭ 80 | | КИБЭ 80 | МХИБЭ 80 | | КИБЭ 80 | МХИБЭ 80 |
| Li | 0,034 | 0,74 | As | 0,11 | 0,19 | Sm | 0,00069 | 0,0015 |
| Be | 0,016 | <0,001 | Se | 0,27 | 0,43 | Eu | 0,00051 | 0,00051 |
| B | 8,1 | 21,9 | Br | 9,48 | 6,53 | Gd | 0,0016 | 0,0012 |
| Na | 131 | 665 | Rb | 0,16 | 2,66 | Tb | 0,00097 | 0,00057 |
| Mg | 99 | 332 | Sr | 0,81 | 1,64 | Dy | 0,00088 | 0,00061 |
| Al | 17 | 17 | Y | 0,0075 | 0,0054 | Ho | 0,00060 | 0,00023 |
| P | 104 | 406 | Zr | 0,045 | 0,031 | Er | 0,00056 | 0,00015 |
| K | 247 | 3346 | Nb | 0,0034 | 0,0041 | Tm | 0,00015 | <0,0001 |
| Ca | 213 | 480 | Mo | 0,044 | 0,091 | Yb | 0,00031 | 0,00031 |
| Ti | 1,65 | 1,40 | Ag | 0,0049 | 0,013 | Lu | 0,00018 | <0,0001 |
| V | 0,07 | 0,12 | Cd | 0,018 | 0,036 | Hf | 0,00080 | 0,00059 |
| Cr | 1,63 | 2,57 | Sn | 0,089 | 0,14 | Ta | 0,00023 | 0,00078 |
| Mn | 14,7 | 22,6 | Sb | 0,071 | 0,048 | W | 0,090 | 0,18 |
| Fe | 18,6 | 18,4 | I | 4,97 | 4,27 | Au | 0,019 | 0,034 |
| Co | 0,013 | 0,12 | Cs | 0,0031 | 0,0105 | Hg | 0,013 | 0,011 |
| Ni | 0,25 | 1,48 | Ba | 1,95 | 2,25 | Tl | 0,0012 | 0,0045 |
| Cu | 1,54 | 3,89 | La | 0,0076 | 0,0083 | Pb | 0,32 | 3,29 |
| Zn | 14,3 | 14,7 | Ce | 0,018 | 0,018 | Bi | 0,0058 | 0,012 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ga | 0,0066 | 0,010 | Pr | 0,00202 | 0,0021 | Th | 0,0014 | 0,0016 |
| Ge | <0,0001 | <0,0001 | Nd | 0,0070 | 0,0076 | U | 0,0029 | 0,0037 |

Примечание: в таблице приведены средние значения 5 измерений

Таким образом, в экстрактах, полученных на 20% спирте этиловом, содержание большинства элементов значительно превалирует над содержанием в экстрактах, полученных на 80% спирте этиловом.

Следующим этапом работы было исследование биологической активности МХИБ20 и КИБЭ20.

## 7.2. Оценка острой токсичности

Исследование острой токсичности ($LD_{50}$) проводили на 30 беспородных белых мышах-самцах средней массой 18-20 г. КИБЭ20, МХИБЭ20 вводили однократно в желудок через зонд в виде водного раствора в дозах от 1000 до 5000 мг / кг (раздел 2.7.2.). При наблюдении в течение 14 суток у животных не происходило изменений поведенческих реакций, признаков диареи, каких-либо других патофизиологических проявлений. Гибель животных не наступила. Следовательно, КИБЭ20, МХИБЭ20, согласно ГОСТ 121007-76 (Государственный стандарт на вредные вещества), можно отнести к 4 классу опасности: «вещества малоопасные».

## 7.3. Оценка противовоспалительной активности сухого экстракта

По результатам исследования антипролиферативного действия МХИБЭ20 на модели «ватной гранулемы» установлено, что введение экстракта в дозе 50 мг/кг способствует снижению воспалительного разрастания гранулематозно-фиброзной ткани у животных на 38,64% по сравнению с контрольной группой.

Массу экссудата в очаге хронического воспаления МХИБЭ20 в дозе 50 мг/кг снижал на 38,5% , препарат сравнения – кислота ацетилсалициловая в дозе 20 мг/кг - на 23,1%.

Установлено, МХИБЭ20 в дозе 150 мг/кг и препарат сравнения – кислота ацетилсалициловая в дозе 20 мг/кг ослабляли флогогенное действие каррагенина, снижая отек воспалительной лапы соответственно на 67,4% и 52,2%, по сравнению с группой контроля.

Таблица 7.6

**Противовоспалительная активность МХИБЭ20**

**(n=6), (M±m; p)**

| Вариант опыта | Каррагениновый отек, мл | Масса гранулемы, г | |
|---|---|---|---|
| | | Сухая грануляционная ткань | Экссудат |
| Контроль | | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| (модель патологии +$H_2O$ эквиобъемно опытному введению) | 0,46 ± 0,04 | 0,044 ± 0,002 | 0,135 ± 0,01 |
| АСК (20 мг/кг) | 0,22 ± 0,02* | 0,047 ± 0,004 | 0,104 ± 0,008 |
| МХИБЭ20 (50 мг/кг) | 0,35±0,01* | 0,027±0,004* | 0,083±0,004* |
| МХИБЭ20 (100 мг/кг) | 0,31±0,04 | 0,043±0,002 | 0,134±0,007 |
| МХИБЭ20 (150 мг/кг) | 0,15±0,06 | 0,039±0,007 | 0,138±0,039 |

* - достоверно по отношению к контролю

Таким образом, проведенные скрининговые исследования свидетельствуют о наличии системной противовоспалительной активности у МХИБЭ20 с преимущественным влиянием на пролиферативную стадию воспалительного процесса.

## 7.4. Оценка гепатопротекторной активности сухого экстракта

### 7.4.1. *Оценка гепатопротекторной активности МХИБЭ20 на модели экспериментального токсического повреждения печени, вызванного введением парацетамола*

По результатам исследования установлено влияние МХИБЭ20 и препарата сравнения карсила на биохимические показатели в сыворотке крови крыс (белковые фракций, АлТ, мочевина, прямой билирубин, ММП – 2,7) и морфологическое строение печени в условиях токсического повреждения печени крыс, вызванного введением парацетамола.

В результате проведенного исследования установлено, что на 7-е сутки после введения парацетамола снижалось содержание альбумина (48,82±0,97 - 41,81± 0,87, p<0,001) и γ-глобулина (13,23±0,57 - 10,71±0,58, p<0,01) (табл. 7.7).

На фоне профилактического введения карсила и МХИБЭ20 концентрация альбумина в сыворотке крови повышалась (парацетамол - 41,81± 0,87; карсил + парацетамол 46,06±0,93, p<0,01, МХИБЭ20 + парацетамол - 44,19±0,8, p<0,01). В отличие от группы крыс с введением карсила, профилактическое введение МХИБЭ20 не сопровождается снижением содержания в сыворотке γ-глобулина (карсил + парацетамол - 9,9±0,55; МХИБЭ20 + парацетамол - 11,1±0,79) (табл. 7.7).

Таблица 7.7

**Влияние парацетамола, карсила и МХИБЭ20 на содержание белковых фракций в сыворотке крови крыс**

| Группы | Альбумины,% | Глобулины, % | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | β1 | $\beta_2$ | γ |
| 1.Интактные | 48,82±0,97 | 11,31±0,54 | 5,53±0,31 | 5,88±0,33 | 15,25±0,33 | 13,23±0,57 |
| 2.Парацетамол | 41,81±0,87 $P_{1-2}$<0,001 | 16,56±0,88 $P_{1-2}$<0,001 | 7,54±0,81 $P_{1-2}$<0,05 | 6,1±0,6 | 17,27±0,74 $P_{1-2}$<0,05 | 10,71±0,58 $P_{1-2}$<0,01 |
| 3.Парацетамол+ карсил | 46,06±0,93 $P_{2-3}$<0,01 | 15,12±1,25 $P_{1-3}$<0,01 | 7,72±0,55 $P_{1-3}$<0,01 | 8,42±1,2 $P_{1-3}$<0,05 | 14,0±0,92 $P_{2-3}$<0,05 | 9,9±0,55 $P_{1-3}$<0,001 |
| 4.Парацетамол+ МХИБЭ20 | 44,19±0,8 $P_{1-4}$<0,01 | 14,31±1,07 $P_{1-4}$<0,05 | 6,78±0,46 $P_{1-4}$<0,05 | 6,24±0,94 | 17,38±1,14 | 11,1±0,79 $P_{1-4}$<0,05 |

При введении парацетамола активность АлТ в сыворотке повыщалась в 4,2 раза по сравнению с группой контроля (2,31±0,29 и 0,55±0,05 ммоль/л×ч, p<0,05 соответственно), содержание прямого билирубина увеличивалось на 63%, мочевины – 22,3% по сравнению с контролем (p<0,05).

На фоне профилактического введения карсила активность АлТ снижалась в 2 раза, содержание мочевины – в 1,4 раза, концентрация прямого билирубина оставалась повышенной. Профилактическое введение МХИБЭ20 приводило к снижению активности АлТ в сыворотке в 2,2 раза, содержание прямого билирубина – в 3,4 раза, мочевины – в 1,6 раза.

Активность в сыворотке ММП – 2,7 при введении парацетамола возрастала до 259,7±14,7 мкмоль/л/ч по сравнению с контролем 190,4±11,35 мкмоль/л/ч, p<0,001. На фоне профилактического введения карсила парацетамол не вызывал достоверных изменений активности ММП – 2,7 (контроль - 190,4 ± 11,35 мкмоль/л/ч; карсил + парацетамол 180,9 ± 7,22 мкмоль/л/ч, p>0,05). Профилактическое введение МХИБЭ20 сопровождалось дальнейшим снижением активности ММП – 2,7 (контроль - 190,4 ± 11,35 мкмоль/л/ч; МХИБЭ20 + парацетамол – 171,0 ± 2,77 мкмоль/л/ч).

## Морфологическое исследование печени

Внутрижелудочное введение парацетамола крысам на 7-е сутки сопровождалось выраженными деструктивными изменениями в паренхиме печени крыс. При гистологическом исследовании печени животных 1 - й группы обнаруживали обширные поля центролобулярных некрозов, объемная плотность которых достигала 49%, а объемная плотность гепатоцитов в состоянии вакуольной дистрофии, вплоть до баллонной дистрофии, составляла 43,9%. При этом численная плотность двуядерных гепатоцитов была на 15% меньшей, в

сравнении с величиной аналогичного показателя у интактных животных, свидетельствуя об угнетении процесса репаративной регенерации на клеточном уровне в печени у крыс, получавших парацетамол (табл. 7.8, рис. 7.5).

Таблица 7.8

**Результаты морфометрического исследования печени при профилактическом введении карсила и МХИБЭ20 на фоне токсического повреждения печени парацетамолом**

| Группы | Нормальная паренхима, Vv, % | Дистрофия гепатоцитов, Vv, % | Некроз гепатоцитов, Vv, % | Двуядерные гепатоциты, Nai |
|---|---|---|---|---|
| 1.Контроль парацетамол | 6,96 ± 0,89 | 49,13 ± 1,91 | 43,91 ± 2,49 | 1,43 ± 0,03 |
| 2. Карсил + парацетамол | 12,3 ± 1,08 | 69,22 ± 1,31 | 18,48 ± 1,05 | 2,63 ± 0,14 $P_{1-2} < 0,05$ |
| 3. МХИБЭ20 + парацетамол | 19,54 ±1,17 $P_{2-3} < 0,05$ | 64,06 ± 1,67 $P_{2-3} < 0,05$ | 16,4 ± 0,55 $P_{2-3} > 0,05$ | 3,17 ± 0,17 $P_{2-3} < 0,05$ |
| 4. Котроль интактные | 97,8 ± 0,65 | 2,11 ± 0,65 | 0,09 ± 0,15 | 1,68 ± 0,11 |

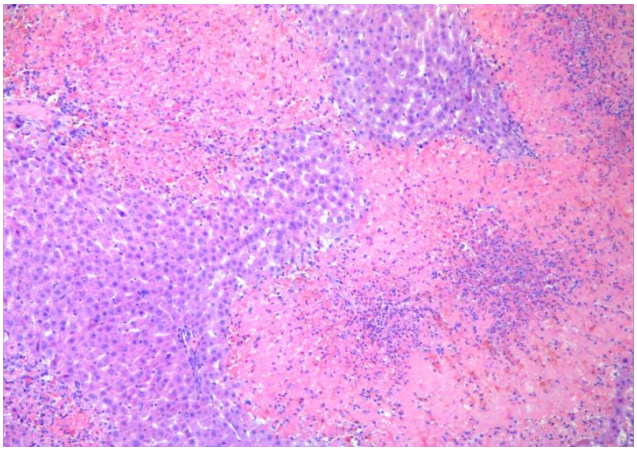
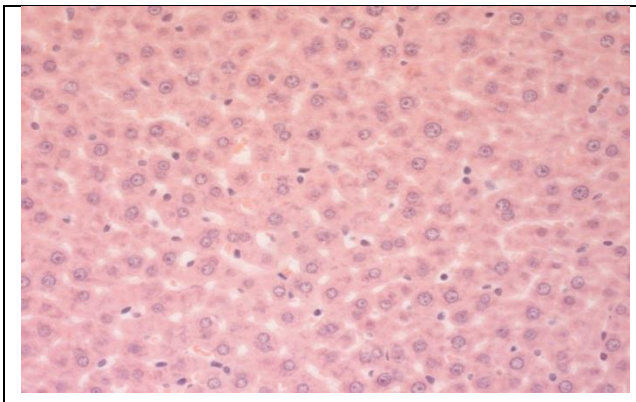
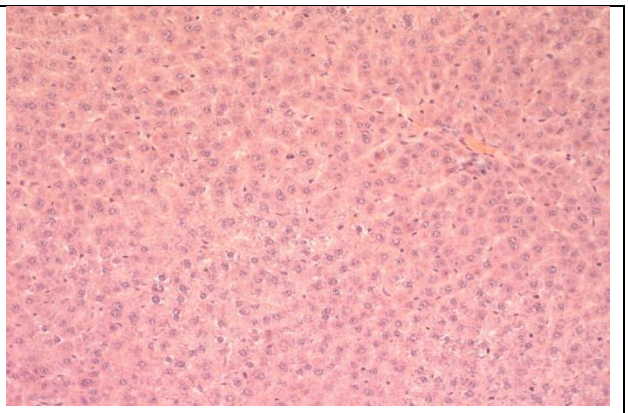


**Рисунок 7.5.** Обширные мостовидные некрозы паренхимы печени после введения парацетамола. Окраска гематоксилином и эозином. Х200

У животных 2 - й и 3 - й групп макроскопически печень была плотно-эластической консистенции и имела красно-коричневую окраску. Некротизированные гепатоциты встречались диссеминированно в центральных отделах печеночных долек, на их периферии, а также перисинусоидально (рис. 7.6, 7.7). Объёмная плотность некрозов гепатоцитов была в 2,4 и в 2,7 раз соответственно меньшей, в сравнении с величиной аналогичного показателя у животных 1-й группы. При этом в паренхиме печени животных 2-й и 3-й групп преобладали дистрофические изменения гепатоцитов в виде мелко- и крупновакуольной дистрофии. Примечательно, что в паренхиме печени

животных 3-й группы объёмные плотности некрозов и дистрофически измененных гепатоцитов были на 11,3 и 7,5 % соответственно меньшими, в сравнении с таковыми у животных 2-й группы. Объёмная плотность неизмененных гепатоцитов у животных, которым профилактически вводили МХИБЭ20, была на 37 % большей, чем у животных с предварительным введением карсила, при этом и численная плотность двуядерных гепатоцитов у крыс, получавших МХИБЭ20, было на 7 % больше в сравнении с величиной аналогичного показателя у животных, получавших карсил (табл. 7.8).

| | |
|---|---|
|  |  |
| **Рисунок 7.6.** Морфологическое строение печени интактной группы животных (×400). | **Рисунок 7.7.** Морфологические изменения в печени в схеме МХИБЭ20 + парацетамол (×100). |

Данные эксперимента свидетельствуют о менее выраженных токсических эффектах парацетамола на фоне профилактического введения как карсила, так и МХИБЭ20, очевидно, в связи со стимулированием репаративного процесса в паренхиме печени, что подтверждается большей численной плотностью двуядерных гепатоцитов в печени животных 2 - й и 3 - й групп (в 1,8 и в 2,8 раз соответственно), в сравнении с таковой у животных 1 - й группы и интактных животных.

Полученные данные свидетельствуют также о способности МХИБЭ20 стимулировать репаративный процесс в паренхиме печени крыс в большей степени при сравнении с эффектом препарата сравнения карсилом, что связано не только с усилением процесса деления гепатоцитов, но и, вероятно, активированием внутриклеточных процессов репаративной регенерации. Снижение активности в крови индикаторного фермента цитолиза - АлТ и большая сохранность белоксинтетической функции также свидетельствуют о значительном снижении токсического действия парацетамола на ткань печени в условиях предварительного введения МХИБЭ20 и карсила.

В литературе активно обсуждается роль матриксных металлопротеиназ как индикаторов деструктивных процессов [299,300,301,302]. Нами показано

значительное повышение в крови активности ММП - 2,7 после введения парацетамола, что коррелирует с тяжестью поражения печени. Парацетамол на фоне профилактического введения МХИБЭ20 и карсила не вызывал гиперпродукции матриксных металлопротеиназ. Активность ММП - 2,7 на фоне карсила сохранялась на уровне интактных, на фоне МХИБЭ20 была ниже на 11 % чем у интактных, что свидетельствует о снижении деструктивных процессов в печени при острой интоксикации ацетаминофеном.

### 7.4.2. *Оценка гепатопротекторной активности КИБЭ20 и МХИБЭ20 на модели экспериментального острого токсического повреждения печени, вызванного введением четыреххлористого углерода*

Четыреххлористый углерод ($CCl_4$) используют в экспериментальных работах как модель токсического повреждения печени. Развивающаяся печеночная недостаточность, связанная с интенсификацией процессов перекисного окисления, продукцией и накоплением высокотоксичных метаболитов, приводит к некрозу гепатоцитов и фиброзу печени [84]. Один из способов коррекции токсических повреждений является применение гепатопротекторов растительного происхождения [212]. Гепатопротекторное действие растительных экстрактов обеспечивается присутствием в их составе фенолкарбоновых кислот, кумаринов, флавоноидов, обладающих фармакологической активностью [254]. В связи с этим было проведено сравнительное исследование сухих экстрактов бересты на данной модели.

Оценку гепатопротекторной активности КИБЭ20 и МХИБЭ20 проводили на основе биохимических показателей (АлТ, общий белок, белковые фракции, ММП - 2,7) и морфологических данных печени.

На 4-е сутки после введения тетрахлорметана в сыворотке крови снижалось содержание общего белка до 45,7±5,15 г/л (64,0±3,97 г/л, $p<0,05$) соотношение альбуминов к глобулинам до 1,0±0,09 (1,5±0,15, $p<0,05$); возрастала доля $\alpha_1$- и $\beta_2$-глобулинов и снижалась доля γ-глобулинов по сравнению с интактными животными (табл. 7.9).

Таблица 7.9

**Процентное содержание белковых фракций в сыворотке крови крыс при введении $CCl_4$**

| Группы | Альбумины, % | Глобулины, % | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $\alpha_1$ | $\alpha_2$ | $\beta_1$ | $\beta_2$ | $\gamma$ |
| 1.Контроль | 48,8±1,0 | 11,3±0,5 | 5,5±0,3 | 5,9±0,3 | 15,3±0,3 | 13,2±0,6 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| интактные (n=20) | | | | | | |
| 2. Контроль $CCl_4$ (n=20) | 47,5 ±1,9 | 15,6±0,6 $P_{1-2}$<0,05 | 6,0±1,2 | 5,97±0,5 | 18,0±0,5 $P_{1-2}$<0,05 | 6,9±0,8 $P_{1-2}$<0,05 |
| 3. Карсил + $CCl_4$ (n=8) | 47,8±1,0 | 13,2±0,5 $P_{3-4}$<0,05 | 5,5±0,5 | 8,4±0,1 | 17,0±0,2 | 8,2±0,8 |
| 4. МХИБЭ20+ $CCl_4$ 100мг (n=12) | 42,8±2,1 $P_{3-4}$<0,05 | 16,0±0,6 | 8,35±1,2 | 6,5±0,5 | 16,2±0,6 $P_{1-4}$<0,05 | 10,0±1,2 $P_{2-4}$<0,05 |

Примечание: Р - достоверность по сравнению с группами.

Предварительное введение карсила сохраняло содержание общего белка в норме 66,9±5,3 г/л и снижало процентное содержание $\alpha_1$ - глобулинов, введение МХИБЭ20 (100 мг/кг) снижало содержание $\beta_2$ - глобулинов и увеличивало содержание $\gamma$ - глобулинов по сравнению с группой II (контроль $CCl_4$).

При введении $CCl_4$ активность АлТ повышалась в 3,3 раза по сравнению с интактной группой животных (1,8 ± 0,26 и 0,55 ± 0,05 ммоль/л×ч соответственно, p<0,05). В группе с профилактическим 5-ти кратным введением карсила активность АлТ в сыворотке незначительно снижалась по сравнению с группой II (1,6±0,2 и 1,8±0,26 ммоль/л×ч соответственно). При предварительном 5-ти кратном введение МХИБЭ20 в дозе 100 мг/кг активность АлТ снижалась до 0,8 ± 0,05 ммоль/л×ч.

Активность в сыворотке ММП при введении тетрахлорметана возрастала до 252,0±11,8 мкмоль/л/ч по сравнению с контролем (190,4±11,3 p<0,05). На фоне профилактического введения карсила и МХИБЭ20 активность ММП в сыворотке крови снижалась и приближалась к показателям контроля (контроль - 190,4±11,3; карсил + $CCl_4$ – 202,8±19,2 мкмоль/л/ч, p > 0,05; МХИБЭ20 + $CCl_4$ – 200,3±12,2 мкмоль/л/ч, p > 0,05).

## Морфологическое исследование печени

Таблица 7.10

**Результаты морфометрического исследование печени крыс на фоне профилактического введения КИБЭ20 и МХИБЭ20 в дозе 100 мг/кг на 4-е сутки после введения $CCl_4$ (M±m)**

| Группы | №№ | Дистрофия гепатоцитов, Vv, % | Некроз гепатоцитов, Vv, % | Нормальная паренхима Vv, % | Двуядерные гепатоциты, Nai |
|---|---|---|---|---|---|
| Контроль интактные | 1 | 3,07±0,8 | 1,34±0,73 | 95,59±2,1 | 1,68±0,11 |
| Контроль $CCl_4$ | 2 | 44,06±0,17 | 38,73±1,5 | 17,21±1,14 | 1,95±0,18 |
| МХИБЭ20 100 мг/кг + $CCl_4$ | 3 | 60,48±1,7 $P_{3-4,5}$<0,05 | 11,9±0,8 $P_{3-2}$<0,05 | 27,61±1,93 $P_{3-2,4,5}$<0,05 | 3,35±0,21 $P_{3-2,4,5}$<0,05 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| КИБЭ20 100 мг/кг + $CCl_4$ | 4 | 84,88±1,18 | 8,07±0,79 | 6,88±0,72 | 2,3±0,17 |
| Карсил 100 мг/кг + $CCl_4$ | 5 | 79,6±1,24 | 11,24±0,78 | 9,31±0,92 | 1,82±0,17 |

Введение $CCl_4$ сопровождалось выраженными деструктивными изменениями в паренхиме печени крыс. Макроскопически печень у животных была тусклой, дряблой по консистенции (рис. 7.10). В паренхиме печени преобладала вакуольная дистрофия гепатоцитов, вплоть до баллонной (44,1%). Плотность очагов некрозов встречались в различных отделах долек и были диссеминированными (38,7%). Полнокровие сосудов печени было неравномерным в сосудах триад, синусоидах и центральных венах. Нормальная ткань составляла 17,2%. Численная плотность двуядерных гепатоцитов превышала на 16% их плотности в контроле. В группе крыс с профилактическим введением МХИБЭ20 в дозе 100 мг/кг объемная плотность неповрежденной ткани в 1,6 раза была больше, а объемная плотность очагов некроза в 3,2 меньше аналогичных показателей в группе контроля $CCl_4$. Полнокровие сосудов было неравномерным, встречалось в сосудах триад, синусоидах и центральных венах (рис. 7.12). Численная плотность двуядерных гепатоцитов в группе “МХИБЭ20 + $CCL_4$ ” превышала их плотность в группе контроль $CCl_4$ в 1,7 раз. По сравнению с карсилом профилактическое введение МХИБЭ20 увеличивало объемную плотность нормальной ткани в 2,9 раза (табл. 7.10) .

В группе крыс с профилактическим введением КИБЭ20 в дозе 100 мг/кг обнаруживали вакуольную дистрофию гепатоцитов (84,9%), объемная плотность очагов некроза и неповрежденной ткани составили 8,1% и 6,9% соответственно (рис. 7.14). В группе с предварительным введением “карсил + $CCl_4$” объемные плотности дистрофически измененных гепатоцитов составляли 79,6% , очагов некрозов 11,09% и неповрежденной ткани 9,31% (табл. 7.10, рис. 7.9).

Таблица 7.11

**Результаты морфометрического исследование печени крыс на фоне профилактического введения КИБЭ20 и МХИБЭ20 в дозе 50 мг/кг на 4-е сутки после введения $CCl_4$ (M±m)**

| Группы крыс | №№ групп | Дистрофия гепатоцитов, Vv , % | Некроз гепатоцитов, Vv, % | Нормальная паренхима, Vv , % | Двуядерные гепатоциты, Nai |
|---|---|---|---|---|---|
| Контроль интактные | 1 | 3,07±0,8 | 1,34±0,73 | 95,59±2,1 | 1,68±0,11 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $CCl_4$ контроль | 2 | 44,06±0,17 | 38,73±1,2 | 17,21±1,14 | 1,95±0,18 |
| МХИБЭ20 50 мг/кг + $CCl_4$ | 3 | 63,95±1,97 $P_{3-4,5}$<0,05 | 9,66±0,46 $P_{3-2}$<0,05 | 24,41±2,13 $P_{3-2,5}$<0,05 | 2,67±0,19 $P_{3-5}$<0,05 |
| КИБЭ20 50 мг/кг + $CCl_4$ | 4 | 74,26±1,28 | 5,69±0,38 $P_{4-5}$<0,05 | 20,05±0,97 $P_{4-5}$<0,05 | 2,32±0,17 |
| Карсил 100 мг/кг + $CCl_4$ | 5 | 79,6±1,24 | 11,24±0,78 | 9,31±0,92 | 1,82±0,17 |

Профилактическое введение МХИБЭ20 в дозе 50 мг/кг сопровождалось увеличением объемной плотности дистрофий в 1,45, неповрежденной ткани и двуядерных гепатоцитов в 1,4 раза и уменьшением некрозов в 4 раза по сравнению с контролем $CCL_4$. По сравнению с карсилом предварительное введение МХИБЭ20 в дозе 50 мг/кг сопровождалось увеличением объемной плотности неповрежденной ткани в 2,6 раза и двуядерных гепатоцитов в 1,5 раза (рис. 7.11). В группе животных с введением КИБЭ20 в дозе 50 мг/кг объемная плотность очагов некроза была в 1,9 раза меньше, объемная плотность неповрежденной ткани в 2 раза больше по сравнению с карсилом (табл. 7.11, рис. 7.13).

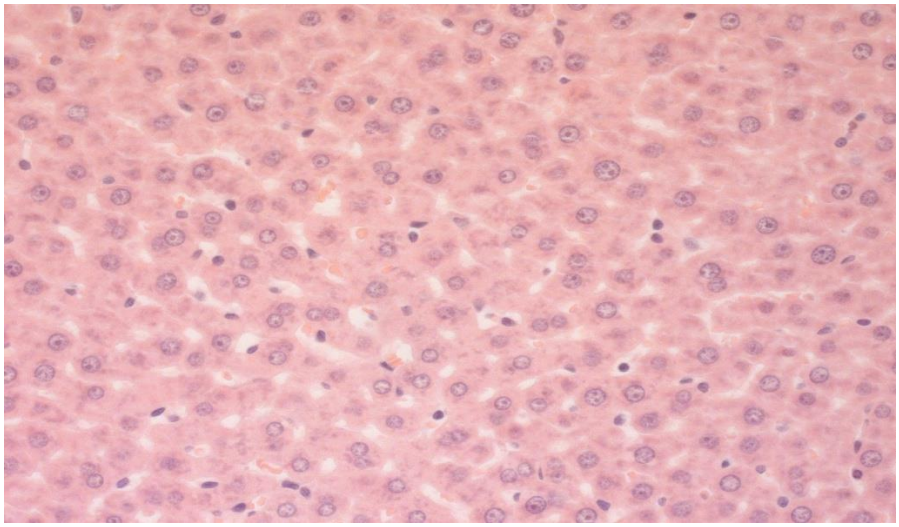
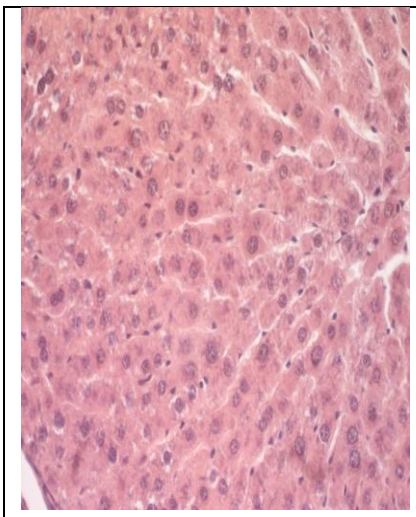
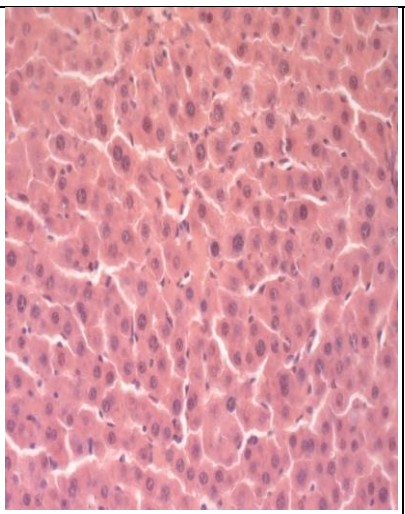
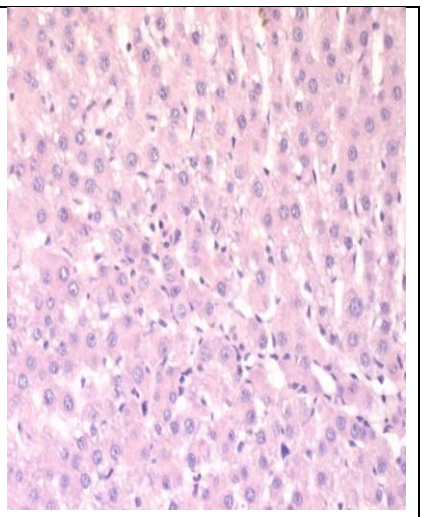
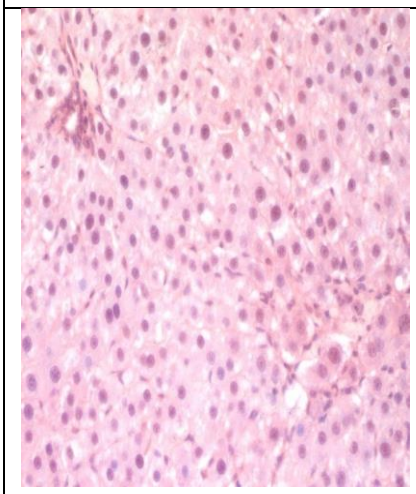
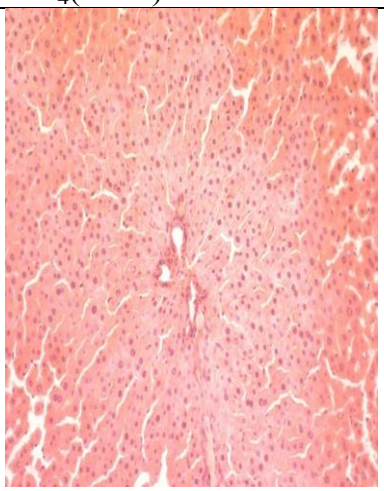
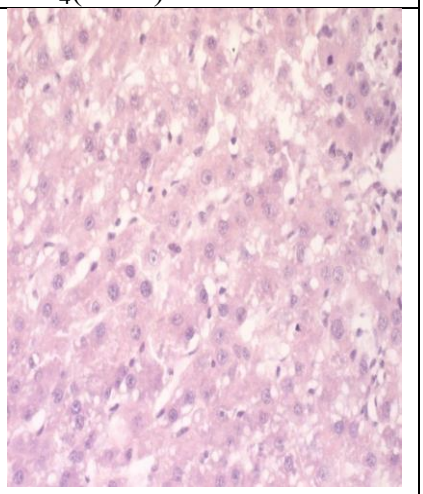


**Рисунок 7.8.** Морфологическое строение ткани печени интактной группы животных (×400)

| | | |
|---|---|---|
|  **Рисунок 7.9.** Морфологические изменения ткани печени при схеме введения карсил (100 мг/кг) + $CCl_4$(×400). |  **Рисунок 7.11.** Морфологические изменения ткани печени при схеме введения МХИБЭ20 (50 мг/кг) + $CCl_4$(×400). |  **Рисунок 7.13.** Морфологические изменения ткани печени при схеме введения КИБЭ20 (50 мг/кг) + $CCl_4$(×400). |
|  **Рисунок 7.10.** Морфологические изменения ткани печени при введении $CCl_4$(×400) |  **Рисунок 7.12.** Морфологические изменения ткани печени при схеме введения МХИБЭ20 (100 мг/кг) + $CCl_4$(×100) |  **Рисунок 7.14.** Морфологические изменения ткани печени при схеме введения КИБЭ20 (100 мг/кг) + $CCl_4$(×400) |

Интрагастральное введение КИБЭ20 и МХИБЭ20 уменьшали повреждение печени вызываемое тетрахлорметаном. Профилактическое внутрижелудочное введение крысам МХИБЭ20 сопровождалось снижением активности в крови фермента цитолиза – АлТ и сохранностью белоксинтетических процессов в ответ на введение $CCl_4$. Значительное повышение в крови активности матриксных металлопротеиназ после введения тетрахлорметана, также является маркером выраженных деструктивных процессов печени [301,302]. При профилактическом введении МХИБЭ20 и карсила не происходило нарастания активности матриксных металлопротеиназ. Активность ММП в сыворотке крови фоне карсила и МХИБЭ20

сохранялась на уровне интактных животных, что свидетельствует о снижении деструктивных процессов в печени при острой интоксикации $CCl_4$. Данные морфометрического исследования подтверждают способность экстрактов бересты уменьшать повреждение печени тетрахлорметаном. На 4-е сутки после введения $CCl_4$ в условиях профилактического введения МХИБЭ20 в дозах 50 и 100 мг/кг объемная плотность очагов некрозов в печени снижалась более чем в 3 раза, предварительное введение КИБЭ20 сопровождалось уменьшением очагов некрозов более чем в 4 раза. При предварительном введении МХИБЭ20 на фоне снижения деструктивных процессов более чем в 2 раза увеличивается объемная плотность нормальной ткани по сравнению с профилактическим введением карсила. Увеличение объемной плотности нормальной ткани в условиях предварительного введения МХИБЭ20 в дозах 50 и 100 мг/кг сопровождается значительным увеличением численной плотности 2-ядерных гепатоцитов в 1,5 и 1,9 раза по сравнению с группой крыс, которым предварительно вводили карсил.

Таким образом, полученные данные по двум моделям токсического повреждения печени свидетельствуют о способности МХИБЭ20 стимулировать репаративный процесс в паренхиме печени крыс в большей степени, чем препарат сравнения карсил, что, возможно, связано не только с усилением процесса деления гепатоцитов, но и, вероятно, с активированием внутриклеточных процессов репаративной регенерации.

**Выводы по главе 7**

1. Установлено, что МХИБЭ20 содержит больший процент дубильных веществ, гидроксикоричных кислот и кумаринов по сравнению с КИБЭ20, КИБЭ80, МХИБ80.
2. Содержание большинства элементов в экстрактах, полученных на 20% спирте этиловом, значительно выше, чем в экстрактах, полученных на 80% спирте этиловом.
3. В МХИБЭ20 содержание большинства элементов в разы меньше, чем в КИБЭ20.
4. Установлено, что МХИБЭ20 проявляет системную противовоспалительную активность с преимущественным влиянием на пролиферативную стадию воспалительного процесса.
5. Установлено, что КИБЭ20 и МХИБЭ20 проявляют гепатопротекторное действие, но наиболее выраженным эффектом обладает МХИБЭ20.
6. При исследовании дозозависимости МХИБЭ20 выявлено, что доза 100 мг/кг массы тела животного эффективнее, чем 50 мг.
7. Сравнительное исследование МХИБЭ20 и карсила выявило наибольшую эффективность МХИБЭ20 при токсических поражениях печени.

# ВЫВОДЫ

1. В бересте *Betula pendula* и *Betula pubescens* установлено наличие первичных (аминокислоты, полисахариды) и вторичных метаболитов (тритерпеновые сапонины, полифенольные окисляемые соединения (дубильные вещества) преимущественно гидролизуемой группы, флавоноиды, кумарины, гидроксикоричные кислоты).

Показано, что береста *Betula pendula* по компонентному составу основных групп БАС (тритерпеновые сапонины, дубильные вещества, кумарины, гидроксикоричные кислоты) идентична бересте *Betula pubescens,* при этом отмечено, что качественный состав БАС остается постоянным, независимо от места произрастания растений и возраста бересты.

2. В бересте обеих видов *Betula pendula* и *Betula pubescens* идентифицированы в составе тритерпеновых сапонинов - бетулин; дубильных веществ – танин; кумаринов – кумарин; гидроксикоричных кислот – кислота хлорогеновая; аминокислот - метионин, треонин, фенилаланин, триптофан, лизин, орнитин, аланин, серин, пролин, кислота глутаминовая, кислота аспарагиновая, глутамин.

3. С помощью физико-химических и гравиметрических методов анализа тритерпеновых сапонинов бересты *Betula pendula* и *Betula pubescens* выделен бетулин и подтверждена его структура. В зависимости от места произрастания содержание тритерпеновых сапонинов значительно варьирует (в Сибирском регионе от 18,0 до 31,0% и в Европейской части России от 18,0% до 36,0%). Наибольшее содержание тритерпеновых сапонинов отмечено для образцов бересты *Betula pubescens,* произрастающей в Пермском крае.

4. Установлено, что механохимическая активация бересты приводит к изменению качественного состава кумаринов, гидроксикоричных кислот, аминокислот, а также способствует увеличению выхода большинства групп БАВ: тритерпеновых сапонинов, кумаринов, полифенольных окисляемых (дубильных) веществ и гидроксикоричных кислот.

Выявлено, что по составу макро- и микроэлементов (61 элемент) бересты оба вида *Betula pendula* и *Betula pubescens* различий не имеют. Механохимическая активация бересты приводит к увеличению содержания отдельных элементов в ней. Содержание токсичных элементов не превышает значения ПДК.

5. Оптимальными технологическими параметрами для получения экстракта бересты сухого являются: экстрагент – спирт этиловый 20%; размер частиц сырья – 3 мм; гидромодуль – 1:40; кратность экстракции – 3; продолжительность экстракции – 30 мин. Механохимическая активация бересты повышает % выхода

основных групп БАС, в результате экстракт бересты *Betula sp.* сухой соответствует исходному сырью по составу основных групп БАС, но значительно превосходит по их удельному содержанию.

6.Экстракт бересты *Betula sp.* сухой обладает выраженными противовоспалительными и гепатопротекторными свойствами и является перспективным для дальнейших детальных фармакологических исследований.

7. Установлены микродиагностические признаки сырья *Betula pendula* и *Betula pubescens,* заключающиеся в структуре клеток пробки при поперечном и продольном сечении.

8. Разработанные параметры стандартизации сырья *Betula pendula* и *Betula pubescens* – «Береста *Betula sp.»* положены в основу проекта фармакопейной статьи «Березы повислой и березы пушистой береста – *Betulae pendulae* и *Betulae pubescens* ***cortex betulinus***», в качестве средства, обладающего противовоспалительными свойствами и гепатопротекторной активностью при токсических повреждениях печени.

**Практические рекомендации.** Результаты диссертационной работы позволяют внедрить материалы диссертации в практику научных исследований и учебного процесса на кафедрах соответствующего профиля ряда образовательных учреждений высшего профессионального образования.

**Перспектива дальнейшей разработки темы.** Результаты диссертационной работы лягут в основу разработки импортозамещающих отечественных препаратов, обладающих противовоспалительной и гепатопротекторной активностью при различных повреждениях печени.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


1. Абышев, А. З. Исследование химического состава экстракта коры березы Cortex Betula сем. Betulaceae / А. З. Абышев, Э. М. Агаев, А. Б. Гусейнов // Химико – фармацевтический журнал. – 2007. – Т. 41. – №8. – С. 22 – 26.
2. Аввакумов, Е.Г. Механические методы активации химических прогрессов / Е.Г. Аввакумов. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд – ние, 1986. – 303 с.
3. Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия: Руководство / Г. Г. Автандилов – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
4. Андреева, В. Ю. Исследование химического состава надземной части манжетки обыкновенной Alchemilla vulgaris L. S. L. / В. Ю. Андреева, Г. И. Калинкина // Химия растительного сырья. – 2000. – №2. – С. 79 – 85.
5. Антропова, И.Г. Радиационно-химические превращения кумарина и его производных в водно-органических растворах: Автореф. дис… канд. хим. наук: 02.00.04, 02.00.09 / И. Г. Антропова. – М., 2010. – 24 с.
6. Арзамасцев, Е.В. Методы токсикологических исследований при разработке новых лекарственных препаратов и современные требования к ним / Е. В. Арзамасцев // Сб. науч. тр.: Состояние и перспективы исследований биологически активных веществ из растений и создание на их основе новых лекарственных препаратов. – М., 1983. – С. 119 – 123.
7. А. с. 1671666 СССР. Диглицидиловый эфир на основе бетулинола в качестве мономера для получения эпоксиполимеров с высокими диэлектрическими свойствами / М. С. Клебанов, В. А. Алдошин. И. П. Петько // Б.И. – 1991. – № 31. – 18 с.
8. А. с. 382657 СССР. Способ выделения бетулина и суберина / Т. И. Федорищев, В. Г. Калайков // Б.И. –1973. –№23. – 66 с.
9. Базарнова, Ю. Г. Биологическая активность сухого экстракта бересты и его применение в масложировых продуктах [Электронный ресурс] / Ю. Г. Базарнова // Науч. журн. СПбГУНИПТ. Сер. Процессы и аппараты пищевых производств. – 2011. – №2. – Режим доступа: www.open-mechanics.com/journals.
10. Банержи, А. Медицинская статистика понятным языком: вводный курс / А. Банержи, под ред. В. П. Леонова. – М.: Практическая медицина, 2007. – 287 с.
11. Батиров, Э. Х. Фенолгликозиды кумаринового ряда / Э. Х. Батиров, М. П. Юлдашев, В. М. Маликов // Химия природных соединений. – 1990. – №5. – С.577 – 592.
12. Белый, А. В. Антирадикальная активность дубильных веществ корневищ Bergenia crassifolia в реакции с 2,2' – дифенил – 1 – пикрилгидразилом / А. В. Белый, Н. И. Белая// Химия растительного сырья. – 2012. – №3. – С. 121 – 126.

13. Биологически активные вещества антиязвенного растительного средства «Вентрофит» / П. Б. Лубсандоржиева [и др.] // Химия растительного сырья. – 2006. – №1. – С. 59 – 64.
14. Болдырев, В. В. Использование механохимии в создании «сухих» технологических процессов / В. В. Болдырев // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – №12. – С. 48 – 52.
15. Болдырев, В.В. Механохимия и механическая активация твердых веществ / В.В. Болдырев // Успехи химии. – 2006. – вып. 75. – №3. – С.203 – 216.
16. Болдырев, В. В. Об истории развития механохимии в Сибири / В. В. Болдырев // Химия в интересах устойчивого развития. – 2002. – №10. – С. 3 – 12.
17. Ведерников, Д. Н. Изменение химического состава корки и луба березы повислой *Betula pendula* Roth. *(Betulaceae)* по высоте дерева / Д. Н. Ведерников, Н. Ю. Шабанова, В. И. Рощин // Химия растительного сырья. – 2010. – №2. – С. 43 – 48.
18. Ведерников, Д. Н. Состав жирных и тритерпеновых кислот углеводородного экстракта из бересты *Betula pendula (Betulaceae)* / Д. Н. Ведерников, В. И. Рощин // Растительные ресурсы. – 2008. – Т.44. – вып. 3. – С. 75 – 82.
19. Ведерников, Д. Н. Химический состав коры березы *Betula pendula* Roth. / Д. Н. Ведерников, Н. Ю. Шабанова, В. И. Рощин: тезисы докладов IV всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. – 2006. – С. 46.
20. Винокурова, Р. И. Изменчивость накопления бетулина и суберина в бересте *Betula pendula* Roth. в зависимости от географической зональности / Р. И. Винокурова, И. Ю. Трошкова // ИВУЗ. «Лесной журнал». – 2008. – №3. – С. 126 – 130.
21. Винокурова, Р. И. Оценка биоиндикационных свойств бетулина и суберина в бересте березы повислой / Р. И. Винокурова, И. Ю. Трошкова, А. И. Винокуров // Вестник МГТУ. Серия «Лес. Экология. Природопользование. – 2009. – №1. – С. 81 – 87.
22. Власюк, П. А. Биологические элементы в жизнедеятельности растений / П. А. Власюк. – Киев: Наукова Думка, 1969. – 526 с.
23. Влияние активации коры березы перегретым паром на выход и состав экстрактов, содержащих бетулин и дубильные вещества / В.А. Левданский [и др.] // Химия растительного сырья. – 2005. – №2. – С. 15 – 20.
24. Влияние механоактивации на структуру и компонентный состав торфа Евроарктического и Сибирского регионов России / Л. Н. Парфенова [и др.] // Фундаментальные исследование. – 2014. – №5. – С. 44 – 49.
25. Влияние условий ацилирования пропионовой кислотой бересты коры березы и ее активации на выход и состав экстрактов / С. А. Кузнецова [и др.] // Журнал

Сибирского федерального университета. Химия. – 2011. – Т. 4. – №3. – С. 248 – 256.
26. Влияние условий ацетилирования и предварительной обработки бересты коры березы на выход и состав тритерпеновых продуктов / С. А. Кузнецова [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2010. – Т. 3. – №2. – С. 174 – 182.
27. Волкова, О. В. Основы гистологии и гистологической техники / О. В. Волкова, Ю. К. Елецкий. – М.: Медицина, 1971. – С. 243–254.
28. Вольф, Э. Определитель деревьев и кустарников Европейской России, Крыма и Кавказа по листья и цветам / Э. Вольф, И. Палибинь. – СПб,. 1904. – 751 с.
29. Встовская, Т. Н. Определитель местных и экзотических древесных растений Сибири / Т. Н. Встовская, И. Ю. Коропачинский. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, филиал «Гео», 2003. – 702 с.
30. Выделение бетулина из бересты березы и изучение его физико – химических и фармакологических свойств / С. А. Кузнецова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2013. – №2. – С. 93 – 100.
31. Выделение бетулина и суберина из коры березы, активированной в условиях «взрывного автогидролиза» / Б. Н. Кузнецов [и др.] // Химия растительного сырья. – 1998. - №1. – С. 5 – 9.
32. Выделение и применение суберина из бересты коры березы / И. Г. Судакова [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2012. – Т. 5. – №32. – С. 168 – 177.
33. Гаврилова, Л. А. Наночастицы гидрофобных природных соединений как адъюванты: Автореф. дис… канд. хим. наук: 03.01.06 / Л. А. Гаврилова. – М., 2011. – 22 с.
34. Георгиевский, В. П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комиссаренко, С. Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1990. – 333 с.
35. Гиниятуллин, Р. Х. Распределение Ca, Mn, Fe, Cu в надземных органах березы повислой в условиях техногенного загрязнения / Р. Х. Гиниятуллин // Вестник Московского государственного университета леса – Лесной вестник. – 2005. – №6. – С. 23 – 25.
36. Глушко, М. П. Изучение тритерпеновых сапонинов травы тысячелистника широколопастного Achillea latiloba Ledeb / М. П. Глушко // Известия вузов Северо – Кавказского региона. Серия: Естественные науки. – 2006. – 7№. – С. 47 – 50.

37. Голяк, Ю. А. Идентификация тритерпеновых сапонинов корневищ с корнями синюхи с помощью тонкослойной хроматографии / Ю. А. Голяк, О. М. Хишова, Н. В. Дубашинская // Вестник фармации. – 2008. – Т. 39. – 1. – С.4 – 8.
38. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание: в 2 т. – М.: Медицинский совет, 2009. – Т.2, ч.1 – 568 с.
39. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание: в 2 т. – М.: Медицинский совет, 2009. – Т.2, ч.2 – 560 с.
40. Государственная фармакопея Российской федерации XII издания. – М.: «Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704 с.
41. Государственная фармакопея СССР: Вып.1 Общие методы анализа/ МЗ СССР., Вып.2 Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11 – е изд. –М.: Медицина, 1987. – 336 с.
42. Грин, Н. Биология: в 3 т. / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор / Пер. с англ. Е.Р. Наумовой, М.С. Морозовой, О.В. Протасовой. – М.: Мир, 1996. – Т. 1. – 368 с.
43. Гринкевич, Н. И. Химический анализ лекарственных растений / Н. И. Гринкевич, Л. Н. Софронич. - М.: Высшая школа, 1983. – 176 с.
44. Гужва, Н. Н. Биологически активные вещества астрагала эспарцетного, произрастающего в Предкавказье / Н. Н. Гужва // Химия растительного сырья. – 2009. – №3. – С. 123 – 132.
45. Гутман Э.М. Механохимия и защита металлов от коррозии / Э.М. Гутман. – М.: Металлургиздат,1981. – 220 с.
46. Динамика содержания фенольных соединений в коре древесных пород средней Сибири / С.Я. Долгодворова [и др.] // Растительные ресурсы. – 1979. – Т.15. – вып. 2. – С. 282 – 285.
47. Долгодворова, С. Я. Экстрактивные вещества древесины и коры древесных пород среднетаежной подзоны Сибири / С.Я. Долгодворова, Л. А. Скринник, Г. Н. Черняева // Растительные ресурсы. – 1976. – Т.12. – вып. 1. – С. 84 – 88.
48. Еремина, Е. Ю. Лекарственные поражения печени / Е. Ю. Еремина // Гастроэнтерология. – 2012. – №1. – С. 16 – 23.
49. Жанатаев, А. К. Влияние экстракта коры растений рода Betula на спонтанный и индуцированный мутагенез у мышей /А. К. Жанатаев, Г. А. Преснова, А. Н. Чистяков, А. Д. Дурнев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – Т. 138. – № 11. – С.535 – 539.
50. Зайбель, И. А. Морфофункциональные изменения органов гомеостатического обеспечения при абиктиновой интоксикации и способы коррекции: Автореф. дис… канд. вет. наук: 16.00.02 / И. А. Зайбель. – Барнаул, 2007. – 18 с.

51. Защитные составы для древесины на основе суберина коры березы / И. Г. Судакова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2005. – №1. – С. 59 – 63.
52. Изменения структурной упорядоченности древесины осины в процессе ее механохимической активации и гидролиза / С. В. Барышников [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Серия. Химия. – 2010. – Т. 3. – №2. – С. 120 – 127.
53. Изучение антимикобактериальной активности сухого экстракта бересты на модели экспериментального туберкулеза у мышей / О. В. Демихова [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2006. – №1. – С. 55 – 57.
54. Изучение иммунотоксичности и аллергизирующих свойств экстракта бересты сухого, содержащего бетулин / Л. П. Коваленко [и др.] // 9 Международный съезд "Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения" (ФИТОФАРМ 2005) и Конференция молодых ученых Европейского Фитохимического Общества "Растения и Здоровье", Санкт - Петербург, 22 - 25 июня, 2005. – СПб, 2005. – С. 501 – 504.
55. Изучение мутаген - модифицирующей активности бересты экстракта сухого (БЭС), содержащего бетулин / А. Д. Дурнев [и др.] // 9 Международный съезд "Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения" (ФИТОФАРМ 2005) и Конференция молодых ученых Европейского Фитохимического Общества "Растения и Здоровье", Санкт - Петербург, 22 - 25 июня, 2005. – СПб, 2005. – С. 492 – 497.
56. Изучение противоаллергенного действия бересты экстракта сухого с содержанием бетулина не менее 70% / Л. П. Коваленко [и др.] // Химико – фармацевтический журнал. – 2009. – Т. 43. - №2. –С. 43 – 47.
57. Изучение профилактического действия "экстракта бересты сухого" в отношении вируса гриппа / Т. В. Пушкина [и др.] // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2005. – №6. – С. 19-22.
58. Изучение состава гексанового экстракта бересты и его токсико – фармакологических свойств / С. А. Кузнецова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2008. - №1. – С. 45 – 49.
59. Изучение состава этанольного экстракта бересты и его токсико-фармакологических свойств / С.А. Кузнецова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2010. - №1. – С. 137 – 141.
60. Изучение экстракции коры березы гексаном, этилацетатом, изопропиловым спиртом и водой продуктов / В. А. Левданский [и др.] // Химия растительного сырья. – 2004. – №2. – С. 17 – 20.

61. Ильдербаев, О. З. Влияние фитопрепарата Be Betula pendula Roth. на иммунобиологическую реактивность организма подвергшегося к сочетанному воздействию радиации 6 Гр и асбестовой пыли в отдаленном периоде / О. З. Ильдербаев // Фундаментальные исследования. – 2008. - №8. – С. 112 – 114.
62. Ингибирование процессов перекисного окисления липидов растительными экстрактами эндемичных растений Казахстана / А.А. Машенцева [и др.] // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2009. – Т. 5. – №4. – С. 11 – 19.
63. Интерфероиндуцирующие свойства сухого экстракта бересты и его влияние на экспериментальную инфекцию, вызванную вирусом гепатита С / Н. Н. Носик [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2005. – №5. – С. 29 – 32.
64. Использование бересты коры березы для получения сорбционных материалов / Е. В. Веприкова [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2012. – Т. 5. – №2. – С. 178 – 188.
65. Использование лекарственных растений Алтайского края для коррекции нарушений липидного обмена / Е. Н. Воробьева [и др.] // Современные наукоемкие технологии. – 2005. – №3. – С. 89 – 90.
66. Использование нанодисперсий, полученных из экстракта бересты, для солюбилизации плохо растворимых в воде веществ / В. В. Красильникова [и др.] // Вестник МИТХТ им. М. В. Ломоносова. – 2008. – Т. 3. – №5. – С. 85 – 89.
67. Использование нингидриновой реакции для количественного определения α-аминокислот в различных объектах / А.В. Симонян [и др.]: методические рекомендации. – Волгоград, 2007. – 106 с.
68. Исследование аминокислотного состава некоторых дикорастущих растений из флоры Республики Башкортостан повислой / С. Р. Хасанова [и др.] // Башкирский химический журнал. – 2013. – Т. 20. – №1. – С. 108 – 110.
69. Исследование аминокислотного состава сфагнума бурого / Н. А. Буркина [и др.] // Химия растительного сырья. – 2000. – №1. – С. 81 – 83.
70. Исследования антиоксидантных и противогипоксических свойств экстракта бересты сухого / В. А. Дубинская [и др.] // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2004. – №12. – С. 34 – 38.
71. Исследование влияния природы экстрагентов в процессе тонкопленочной парофазной экстракции на состав, степень извлечения и форму получаемых продуктов / В. В. Жук [и др.] // Известия Томского политехнического университета. – 2007. – Т. 311. - №3. – С. 99 – 101.
72. Исследование иммунотоксичности и аллергенности экстракта бересты сухого, содержащего бетулин / Л. П. Коваленко [и др.] // Химико – фармацевтический журнал. – 2007. – Т. 41. – №1. – С. 18 – 20.

73. Исследование некоторых фармакологических свойств бисгемифталата бетулина / О. Б. Флехтер [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – №4. – С. 56 – 59.
74. Йорданов, Д. Фитотерапия. Лечение лекарственными травами: 4-е русское изд. / Д. Йорданов, П. Николов, Асп. Бойчинов. – София: Медицина и физкультура, 1976. – 349 с.
75. Качественный и количественный анализ сырья и препаратов солодки / М. В. Егоров [и др.] // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2005. – №1. – С. 175 – 180.
76. К вопросу комплексного изучения березы повислой (*Betula pendula* Roth.), произрастающей в Красноярском крае / Г. Г. Первышина [и др.] // Химия растительного сырья. – 2002. - №3. – С. 17 – 20.
77. Кислицын, А. Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение / А. Н. Кислицын // Химия древесины. – 1994. – №3. – С. 3 – 28.
78. Клинико – экспериментальное изучение бетулинола при гепатите С / В. Ф. Корсун [и др.] // 9 Международный съезд "Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения" (ФИТОФАРМ 2005) и Конференция молодых ученых Европейского Фитохимического Общества "Растения и Здоровье", Санкт - Петербург, 22 - 25 июня, 2005. – СПб, 2005. – С. 504 – 508.
79. Козяев, М. А. Эффективность лечения хронического туберкулезного воспаления пролонгированной лизосомотропной формой изониазида (морфологическое исследование): Афтореф. дис… канд. мед. наук: 14.00.15 / М. А. Козяев. – Новосибирск, 1999. – 23 с.
80. Королева, Л. Р. Современные гепатопротекторы / Л. Р. Королева // Российский медицинский журнал. – 2005. – №2. – С. 35 – 37.
81. Коропачинская, Н. В. Каталитическое окисление березового луба кислородом в сиреневый альдегид и ванилин / Н. В. Коропачинская, В. Е. Тарабанько, В. А. Левданский // Химия растительного сырья. – 2004. – №1. – С. 27 – 30.
82. Корулькин, Д. Ю. Природные флавоноиды / Д. Ю. Корулькин [и др.]. – Новосибирск: Академическое изд – во «Гео», 2007. – 232 с.
83. Косицын, В. Н. Использование пищевых и лекарственных ресурсов, технического сырья в березовых лесах России / В. Н. Косицын // Лесные биологически активные ресурсы (березовый сок, живица, эфирные масла, пищевые, технические и лекарственные растения): материалы III междунар. конф. (Хабаровск, 25-27 сент. 2007 г.). - Хабаровск, 2007. – С. 313 – 318.

84. Кравченко, Л. В. Характеристика острого токсического действия четыреххлористого углерода как модели окислительного стресса / Л. В. Кравченко // Токсикологический вестник. – 2009. – №1. – С. 12 – 18.
85. Красильников, И. В. Изучение возможности использования нанодисперсии экстракта бересты в качестве адъюванта вакцинных препаратов / И. В. Красильников // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26. – №2. – С. 65 – 67.
86. Крылов, Г. В. Травы жизни и их искатели: 2 - ое изд. / Г.В. Крылов. – Новосибирск: Западно - сибирское книжное издательство, 1972. – 437 с.
87. Кузнецова, С. А. Изучение антиоксидантной активности этанольного экстракта коры березы / С. А. Кузнецова, Н. М. Титова, Г. П. Скворцова // Химия и технология растительных веществ: тезисы докладов V всероссийской научной конференции. – Уфа. – 2008. – С. 176.
88. Кузнецова, С. А. Изучение гастропротетивных свойств бетулина и гексанового экстракта коры березы / С. А. Кузнецова, О. Ф. Веселова, Е. С. Редькина // Химия и технология растительных веществ: тезисы докладов V всероссийской научной конференции. – Уфа. – 2008. – С. 174.
89. Кузнецов, Б. Н. Продукты комплексной переработки биомассы березы / Б. Н. Кузнецов, С. А. Кузнецова, В. А. Левданский // Химия и технология растительных веществ: тезисы докладов V всероссийской научной конференции. – Уфа. – 2008. – С. 43.
90. Кузнецов, Б.Н. Экстракция бетулина низшими алифатическими спиртами из внешней коры березы *Betula pendula* Roth., активированной перегретым паром в присутствии щелочи / Б. Н. Кузнецов, В. А. Левданский, Н. И. Полежаева // Химия растительного сырья . – 2004. – №2. – С. 21 – 24.
91. Кулагин, Е. П. Использование отходов химической переработки коры в качестве удобрений / Е. П. Кулагин, А. Н. Кислицын, В. В. Рябков // Хвойные бореальной зоны. – 2003. – вып. 1. – С. 128 – 129.
92. Куцик, Р. В. Береза бородавчатая (Береза повислая) Betula verrucosa Ehrh. (Betula pendula Roth.) (Аналитический обзор) / Р. В. Куцик, Б. М. Зузук // Провизор. – 2001. – №10. – С. 34 – 41.
93. Лаврова, Л. Ю. Механоактивированные органопорошки - биокорректоры питания / Л. Ю. Лаврова, И. А. Якутова, Г. А. Усов // Материалы I международной научно-практической конференции «Интеграция науки, образования и производства - стратегия развития инновационной экономики». Секция 2. Интеграция науки и производства. Трансфер технологий. Ч. 1. – Екатеринбург: Изд-во Урал. гос. экон.ун-та, 2011. — С. 167-169.

94. Лаптева, Е. Н. Специфическая активность полипренольного препарата «Ропрен» при токсическом поражении печени в эксперименте / Е. Н. Лаптева, В. И. Рощин, В. С. Султанов // Клиническое питание. – 2007. – №3. – С. 28 – 32.
95. Лазурьевский Г. В. Практические работы по химии природных соединений: 2- ое изд. / Г. В. Лазурьевский, И. В. Терентьева, А. А. Шамшурин. – М.: Высшая школа, 1966. – 335 с.
96. Левданский, В. А. Новые способы одностадийного синтеза аллобетулина, бензоата и фталата аллобетулина / В. А. Левданский, А. В. Левданский, Б. Н. Кузнецов // Химия растительного сырья. – 2010. – №1. – С. 75 – 80.
97. Левданский, В.А. Получение антоцианидиновых красителей из луба коры березы *Betula pendula* Roth. / В. А. Левданский, Б. Н. Кузнецов // Химия растительного сырья. – 2004. – №3. – С. 25 – 28.
98. Левданский, В. А. Ценные химические продукты из коры лиственницы, пихты и березы / В. А. Левданский // Вестник Красноярского государственного университета. – 2003. – №2. – С. 67 – 73.
99. Левданский, В.А. Экстракционная переработка коры березы без ее предварительного разделения на бересту и луб / В.А. Левданский, Н.И. Полежаева, Б.Н. Кузнецов // Вестник КрасГУ. – 2004. – №2. – С. 68 – 73.
100. Лекарственное растительное сырье растительного и животного происхождения. Фармакогнозия: учеб. пособие / под. ред. Г.П. Яковлева. – 2-е изд., испр. и доп. - СПб.: СпецЛит, 2010. – 863 с.
101. Либберт, Э. Физиология растений / Э. Либберт. – М.: Мир,1976. – 580 с.
102. Ложкин, А. В. Природные кумарины: методы выделения и анализа (обзор) / А. В. Ложкин, Е. И. Саканян // Химико – фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 40. – № 6. – С. 47 – 56.
103. Ломовский, И. О. Влияние условий механохимической обработки на экстракцию гиперицина из травы зверобоя / О. И. Ломовский // Химия растительного сырья. – 2012. – №3. – С. 93 – 99.
104. Ломовский, О. И. Прикладная механохимия: фармацевтика и медицинская промышленность / О. И. Ломовский // Обработка дисперсных материалов и сред: межд. периодический. сб. научн. трудов. – 2001. – вып. 11. – С. 81 – 100.
105. Манаков, Ю. А. Оценка выращивания древесных пород на отвалах угольных предприятий Кузбасса / А. Н. Кислицын // Вестник КрасГАУ. – 2009. – №4. – 94 – 98.
106. Мараховский, Ю. Х. Гепатопротекторы: потенциальные возможности и ограничения защиты печени / Ю. Х. Мараховский, Ю. П. Рубенс // Медицина. – 2004. – №1. – С. 9 – 13.

107. Мараховский, Ю. Х. Клиническая оценка потенциальных возможностей и ограничений гепатопротекторов / Ю. Х. Мараховский // «Рецепт». – 2005. – Т. 39. – №1. – С. 42 – 50.
108. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: в 2 - х т. / М.Д. Машковский. - 11- е изд. стер. – Т. 2. - М.: Медицина, 1998. – 576 с.
109. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: 16-е изд. перераб. и доп. / М.Д. Машковский. – М.: Новая волна, 2010. – 1216 с.
110. Меркулов, Г.А. Курс патологогистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 645 с.
111. Микроскопическая техника : Руководство / Под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. – М. : Медицина, 1996. – 544 с.
112. Минеральные вещества – основа снижения антропогенного воздействия окружающей среды на организм человека / А. А. Ефремов [и др.] // Химия растительного сырья. – 2002. – №3. – С. 65 – 68.
113. Мирович, В. М. Исследование фенольных соединений очанки гребенчатой, произрастающей в Прибайкалье / В. М. Мирович, А. Л. Самбаров, С. М. Шакалова // Вопросы естествознания. Серия: Биология, ботаника, почвоведение. – 2013. – вып.1. - №1. – С. 34 – 36.
114. Молоковский, Д.С. Хронический гепатит С: принципы и перспективы фитотерапии (обзор литературы) / Д.С. Молоковский, Е.В. Эсауленко, О.О. Павлова // Биомедицинский журнал. – 2006. – Т. 7. – С. 320 – 336.
115. Надеев, А. П. Морфогенез генерализованного хронического туберкулезного воспаления при многократном, различном по ритму и интенсивности воздействия сресс – фактора: Автореф. дисс… канд. мед. наук: 14.00.15 / А. П. Надеев. – Новосибирск, 1998. – 26 с.
116. Науменко, З.М. Продуктивность и биохимический состав фитомассы березы в чистых березняках нечерноземной зоны РСФСР / З. М. Науменко // Растительные ресурсы. – 1978. – Т. 14. – вып. 1. – С. 126 – 131.
117. Никитенко М. А. Видовая специфика поглощения тяжелых металлов (Cu, Zn, Mn и Fe) древесными растениями Камбарки Удмуртской республики / М. А. Никитенко // Вестник ИжГТУ. – 2007. – №2. – С. 158 – 159.
118. Никитина, Л. Е. Физические методы идентификации органических соединений / Л. Е. Никитина, В. В. Племенков. – Казань, 2003. – 92 с.
119. Никонов, Г. К. Основы современной фитотерапии / Г. К. Никонов, Б. М. Мануйлов. –М.: Медицина, 2005. - 520 с.

120. Новиков, В. Е. Фармакология гепатопротекторов / В. Е. Новиков, Е. И. Климкина // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2005. – Т. 4. – №1. – С. 2 – 20.
121. Озимина, И.И. Целенаправленный поиск биологически активных веществ в растениях / И. И. Озимина, О.О. Фролова // Современные проблемы науки и образования. Москва: Электронное научное издание КубГМУ. – 2013. - №1.
122. Определение биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах методами хроматографии / М. В. Кочетова [и др.] // Успехи химии. – 2007. – Т. 76. – вып. 1. – С. 88 – 100.
123. Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавок методом масс – спектрометрии с индуктивно – связанной аргоновой плазмой: Методические указания МУК 4.1.1483 – 03. – М.: ФЦ ГСЭН МЗ РФ, 2003. – 36 с.
124. Определитель растений Алтайского края / И. М. Красноборов [и др.]. – Новосибирск: Изд – во СО РАН, филиал «Гео», 2003. – 634 с.
125. Определитель растений Республики Тыва / И. М. Красноборов [и др.]. – Новосибирск: Изд – во СО РАН, 2007. – 671 с.
126. Определитель растений юга Красноярского края / М. И. Беглянова [и др.]. – Новосибирск: Наука, Сибирское отделение. – 1979. – 670 с.
127. О случае аномально высокого содержания лупеола в коре белой березы / Г. А. Толстиков [и др.] // Журнал прикладной химии. – 1967. – №4. – С. 920 – 921.
128. ОСТ 91.500.05.001 – 00. «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения»; Введ. 01.11.2001; Приказ Минздрава РФ № 388. – М.: Минздрав РФ, 2001. – 28 с.
129. ОФС 42 – 0013 – 03. «Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб». – Взамен ГФ XI, вып. 1, ст. 267; Введ. 16.06.2003. – М.: Минздрав РФ, 2003. – 8 с.
130. Оценка влияния диникотината и бисгемифталата бетулина на уровень адениловых нуклеотидов и никотинамидных коферментов при экспериментальной интоксикации тетрахлорметаном / О. Б. Флехтер [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии . – 2009. – №5. – С. 37 – 40.
131. Ошкордин, О. В. Кинетика и динамика измельчения растительного сырья для производства пищевых продуктов / О. В. Ошкордин, Л. Ю. Лаврова, Г. А. Усов // Ползуновский вестник. – 2011. – № 2/2. – С.202 – 206.
132. Павлова А. С. Разработка технологии механохимической обработки бересты с извлечением биологически активных веществ / А. С. Павлова, Б. М. Кершегольц

// Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья : материалы III Всероссийской научной конференции. — Барнаул, 2007. — С. 386–387.

133. Панченко, Л. Ф. Клиническая биохимия микроэлементов / Л. Ф. Панченко, И. В. Маев, К. Г. Гуревич. – М.: ГОУ ВУНМУ МЗ РФ, 2004. – 368 с.
134. Пат. №2074867 Способ получения бетулина / Б. Н. Кузнецов [и др.] – заявитель и патентообладатель. – опубл. 1997, Бюл. №7. – С. 179.
135. Пат. № 2155600, приоритет от 25.03.1999 Способ получения растительного экстракта, регенерирующего клетки кожи / Р. В. Цевелев. – заявитель и патентообладатель. – опубл. 10.09.2000, Бюл. №25. – С. 246.
136. Пат. № 2206572, приоритет от 12.03.2002 Способ выделения бетулинола / М. С. Борц, Е. Г. Николаева, И. С. Лаевский. - заявитель и патентообладатель. – опубл. 20.06.2003, Бюл. №17. – С. 681 - 682.
137. Пат. № 2234936, приоритет от 25.06.2003 Способ получения бетулина из березовой коры / Ю. И. Стернин, С. В. Куликов. – заявитель и патентообладатель. – опубл. 27.08.2004, Бюл. №24. – С. 392.
138. Пат. № 2244554, приоритет от 28.08.2003 Средство для лечения вирусного гепатита С / П. Г. Дерябин, Д. К. Львов. – заявитель и патентообладатель. – опубл. 20.01.2005, Бюл. №2. – С. 431.
139. Пат. 2252773, приоритет от 24.12.2003 Антигипоксическое средство / М. А. Калинкина, В. В. Балакшин, А. Н. Чистяков. – заявитель и патентообладатель. – опубл. 27.05.2005, Бюл. №15. – С. 740.
140. Пат. № 2252775, приоритет от 12.04.2004 Индуктор интерферона / Н. Н. Носик, В. В. Балакшин, А. Н. Чистяков. – заявитель и патентообладатель. – опубл. 27.05.2005, Бюл. №15. – С. 740.
141. Пат. № 2262349, приоритет от 21.06.2004 Средство для лечения и профилактики туберкулеза / И. В. Бочарова [и др.]. – заявитель и патентообладатель. – опубл. 20.10.2005, Бюл. №29. – С. 419.
142. Пат. № 2264820, приоритет от 15.01.2004 Средство для профилактики вирусного гепатита С / П. Г. Дерябин [и др.]. – заявитель и патентообладатель. – опубл. 27.11.2005, Бюл. №33. – С. 243.
143. Пат. 2298558, приоритет от 13.02.2006 Способ получения экстрактивных веществ из бересты березы типа / В. В. Жук [и др.]. – заявитель и патентообладатель. – опубл. 10.05.2007, Бюл. №13. – С. 533.
144. Пат. 2304976, приоритет от 30.12.2005 Способ лечения сахарного диабета 2 типа / В. А. Мещерякова [и др.]. – заявитель и патентообладатель. – опубл. 27.08.2007, Бюл. №24. – С. 151.

145. Пат. 2314821, приоритет от 23.01.2007 Антимикробное средство / Т. Ф. Никуленкова, А. Г. Афиногенова. – заявитель и патентообладатель. – опубл. 20.01.2008, Бюл. №2 – С. 604.
146. Пат. 2319497, приоритет от 09.12.2005 Средство для повышения устойчивости организма к вирусным и вирус индуцированым заболеваниям / М. С. Борц [и др.]. – заявитель и патентообладатель. – опубл. 20.03.2008, Бюл. №8. – С. 487.
147. Пат. 2322091, приоритет от 01.08.2006 Композиция биологически активных веществ и способ получения нанодисперсии ее / А. П. Каплун, В. В. Балакшин, А. Н. Чистяков. – заявитель и патентообладатель. – опубл. 20.04.2008, Бюл. №11. – С. 348.
148. Пат. 2355423, приоритет от 12.09.2007 Адъювант / С. К. Старов [и др.]. – заявитель и патентообладатель. – опубл. 20.05.2009, Бюл. №14. – С. 720.
149. Петрова, Ч. А. Определение острой токсичности сбора, применяемого для лечения хронического панкреатита в стадии обострения / Ч. А. Петрова // Вопросы теоретической и практической медицины: Матер. 67 – й респ. науч. – практ. конф. – Уфа, 2002. – С. 65.
150. Получение бетулиновой кислоты из экстракта бетулина. Противовирусная и противоязвенная активность некоторых родственных терпеноидов / Е. И. Бореко [и др.] // Химико – фармацевтический журнал. – 2002. – №9. – С. 26 – 28.
151. Получение водорастворимых компонентов термообратимых гелей из древесины березы / Б. Н. Кузнецов [и др.] // Химия растительного сырья. – 2004. – №1. – С. 53 – 59.
152. Получение диацетата бетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантной активности / С. А. Кузнецова [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2008. – Т. 1. – №2. – С. 151 – 165.
153. Получение дубильных веществ, красителей и энтеросорбентов из луба березовой коры / С. А. Кузнецова [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. – Т. 13. – №3. – С. 401 – 409.
154. Получение нетоксичных композитов бетулина с поливинилпирролидоном и полиэтиленгликолем / Т. П. Шахтшнейдер [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Химия. – 2012. – Т. 5. – №1. – С. 52 – 60.
155. Получение пленкообразующих материалов из суберина коры березы повислой / И. Г. Судакова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2004. – №1. – С. 31 – 34.
156. Получение сухого экстракта из корней девясила высокого и изучение его химического состава / С. А. Матасова [и др.] // Химия растительного сырья. – 1999. – №2. – С. 119 – 123.

157. Получение энтеросорбентов из отходов окорки березы / Е. В. Веприкова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2005. – №1. – С. 65 – 70.
158. Похило, Н. Д. Изопреноиды различных видов рода Betula / Н. Д. Похило, Н. И. Уварова // Химия природных соединений. – 1988. – № 3. – С. 325 – 341.
159. Применение зонного капиллярного электрофореза для определения сапонинов в водных растворах / А. В. Калач [и др.] // Химия растительного сырья. – 2006. – №4. – С. 39 – 43.
160. Протасова, Н. А. Микроэлементы: биологическая роль, распределение в почвах, влияние на распространения заболеваний человека и животных / Н. А. Протасова // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – №12. – С. 32 – 37.
161. Противогерпетическая активность "бересты экстракта сухого" / Т. В. Тополева [и др.] // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2005. – №8. – С. 63 – 65.
162. Противовирусные свойства суммы тритерпеновых соединений, выделенных из верхнего слоя коры березы, в отношении вируса гриппа птиц A/H5 в опытах in vivo / С. С. Ямникова [и др.] // 10 Международный съезд Фитофарм 2006 "Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения", Санкт - Петербург, 27 - 30 июня, 2006. – СПб, 2006. – С. 389 – 390.
163. Противовоспалительные и противоязвенные свойства бисгемифталата бетулина / О. Б. Флехтер [и др.] // Химико – фармацевтический журнал. – 2002. – №8. – С. 32 – 33.
164. Противовоспалительные свойства экстрактов *Agrimonia pilosa* Ledeb и бересты *Betula pendula* Roth. / С. П. Позднякова [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2011. – Т. 71. – №5. – С. 39 – 42.
165. Путырский, И. Н. Универсальная энциклопедия лекарственных растений / И.Н. Путырский, В.Н. Прохоров. – Мн.: Книжный дом; М.: Махаон, 2000. – 656 с.
166. Радькова, Е. А. Комплексная эколого – гигиеническая оценка экстракционной переработки коры березы: Автореф. дис… канд. мед. наук: 14.00.07 / Е. А. Радькова. – СПб., 2007. – 24 с.
167. Разработка методов качественного и количественного определения бетулина в составе сухого экстракта бересты и косметических кремов / А. В. Белякова [и др.] // 9 Международный съезд "Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения" (ФИТОФАРМ 2005) и Конференция молодых ученых Европейского Фитохимического Общества "Растения и Здоровье", Санкт - Петербург, 22 - 25 июня, 2005. – СПб, 2005. – С. 483 – 488.

168. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т.1. Семейства Magnoliaceae – Juglandaceae, Ulmaceae, Moraceae, Cannabaceae, Urticaceae / Отв. ред. А. Л. Буданцев. – СПб.,; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 421 с.
169. Регистр лекарственных средств России. - http://www.rlsnet.ru/.
170. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. – 2 изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005.- 832 с.
171. Сапонины растений Polemonium coeruleum L. и Beta vulgaris L. Особенности получения, сравнительная оценка гипогликемической активности / С. А. Боева [и др.] // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2007. – №1. – С. 139 – 141.
171.1.Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие: в 3-х томах /И.А. Самылина, В.А. Ермакова, И.В. Бобкова, О.Г. Аносова. – М.: ГЕОТАР – Медия, 2009. – Т.3. – 488с.
172. Семенов, А. А. Природные противоопухолевые соединения (структура и механизм действия) / А. А. Семенов. – Новосибирск: Наука, СО, 1979 . – 220 с.
173. Свойства и применение сорбционных материалов из луба коры березы / Е. В. Веприкова [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2008. – Т. 1. – №3. – С. 286 – 292.
174. Синтез биологически активных тритерпеновых соединений на основе бетулина / Б. Н. Кузнецов [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2011. – Т. 4. – №4. – С. 408 – 423.
175. Синтез диацетата бетулина и аллобетулина из бетулин – суберинового комплекса коры березы / С. А. Кузнецова [и др.] // Химия и технология растительных веществ: тезисы докладов V всероссийской научной конференции. – Уфа. – 2008. – С. 175.
176. Синтез дипропионата бетулина из бересты коры березы / С. А. Кузнецова [и др.] // Химия растительного сырья . – 2011. – №4. – С. 77 – 82.
177. Синтез и противовоспалительная активность новых ацилпроизводных бетулина / Л. А. Балтина [и др.] // Химико – фармацевтический журнал. – 2002. – №9. – С. 29 – 32.
178. Синтез и фармакологическая активность ацилированных оксимов бетулоновой кислоты и 28 – оксо – аллобетулона / Е. И. Бореко [и др.] // Химико – фармацевтический журнал. – 2004. – №3. – С. 31 – 34.
179. Синтез и фармакологическая активность диникотината бетулина / О. Б. Флехтер [и др.] // Биоорганическая химия. – 2002. – Т. 28. – №6. – С. 543 – 550.

180. Синтез циклопропановых производных бетулиновой и бетулоновой кислот и их противоопухолевая активность / А. В. Сымон [и др.] // Биоорганическая химия. – 2005. – Т. 31. – №3. – С. 320 – 325.
181. Скальный, А. В. Химические элементы в физиологии и экологии человека / А. В. Скальный. – М.: Издательский дом «ОНИКС 21 век»: Мир, 2004. – 216 с.
182. Скворцов, В. Э. Ключ для определения сосудистых растений средней полосы европейской России по вегетативным признакам / В. Э. Скворцов. - М.: Изд-во МГУ, 2001. – 171 с.
183. Совершенствование методов выделения, изучения состава и свойств экстрактов березовой коры / Б.Н. Кузнецов [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. - №3. – С. 391 – 400.
184. Сравнительный анализ методик количественного определения тритерпеновых сапонинов – производных олеаноловой кислоты / Н. В. Мироненко [и др.] // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2009. – Т. 75. – №5. – С. 19 – 23.
185. Сравнительный анализ состава незаменимых аминокислот в продукции основных сельскохозяйственных культур / Ю. В. Путянин [и др.] // Вестник национальной Академии наук Беларуси. Серия аграрных наук. – 2014. – №3. – С. 60 – 68.
186. Стрелкова, Л. Б. Исследование влияния «бересты экстракта сухого» на ключевые ферменты биотрансформации и на микросомальные мембраны печени крыс / Л. Б. Стрелкова, М. Ф. Минеева, Т. В. Тополева // Химико – фармацевтический журнал. – 2007. – Т. 41. - №5. – С. 32 – 36.
187. Структурно – функциональные свойства тритерпеноидов ряда лупана. 3. Цитотоксическая активность бетулина, дигидробетулина и их производных на карциноме Эрлиха в условиях культуры in vitro / Е. Б. Шенцова [и др.] // Растительные ресурсы. – 2005. – Т. 41. – №2. – С. 116 – 122.
188. Судакова, И. Г. Изучение процесса выделения субериновых веществ из бересты березовой коры / И. Г. Судакова, Б. Н. Кузнецов, Н. В. Гарынцева // Химия растительного сырья. – 2008. – №1. – С. 41 – 44.
189. Судакова, И. Г. Экологически безопасные огнезащитные покрытия на основе суберина коры березы / И. Г. Судакова, Н. В. Гарынцева // Химия и технология растительных веществ: тезисы докладов V всероссийской научной конференции. – Уфа. – 2008. – С. 265.
190. Суханов, Д. С. Гепатопротекторная терапия лекарственных поражений печени при туберкулезе органов дыхания: Информационно – методическое письмо / Д. С. Суханов, А. К. Иванов. – СПб.: Тактик – Студио, 2010. – 48 с.

191. Терпеноиды ряда лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы I. Природные производные лупана / Т.Г. Толстикова [и др.] // Биоорганическая химия. – 2006. – Т.32. - №1. – С. 42 – 55.
192. Твердофазный синтез феноксиуксусной кислоты в условиях механохимической активации / Ю. Е. Сапожников [и др.] // Башкирский химический журнал. – 2008. – Т. 15. – №1. – С. 11 – 13.
193. Трошкова, И. Ю. Ресурсный потенциал бетулина и суберина березовых лесов Восточно-Европейской равнины: Автореф. дис… канд. биол. наук: 03.00.32 / И. Ю. Трошкова. – Йошкар – Ола, 2005. – 24 с.
194. Турова, А. Д. Лекарственные растения СССР и их применение: – 3-е изд., перераб. и доп. / А. Д. Турова, Э. Н. Сапожникова – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
195. Турова, А. Д. Лекарственные растения СССР и Вьетнама / А. Д. Турова, Э. Н. Сапожникова, Вьен Дыок Ли – М.: Медицина, 1987. – 464 с.
196. Фиброз печени: механизмы развития и вопросы терапии / Э. П. Яковенко [и др.] // Фарматека. – 2011. - № 12. – С. 16 – 22.
197. Филимонов, П. Н. Морфологические особенности развития хронического диссеминированного воспаления в печени и легких при лечении лизосомотропной пролонгированной формой изониазида: Автореф. дисс… канд. мед. наук: 14.00.15 / П. Н. Филимонов. – Новосибирск, 1996. – 21 с.
198. Флора Казахстана. – В 9 т. – Т. 3: Ивовые – Гвоздичные / сост. Н. Т. Агеева [и др.]. – Алма – Ата: Издательство Академии Наук Казахский ССР, 1960.– 460 с.
199. Флора Сибири. – В 14 т. – Т. 5: Salicaceae – Amaranthaceae / сост. М. Н. Ломоносова [и др.]. – Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1992. – 312 с.
200. Флора СССР. – В Т.30 – Т.5/ сост. Е. Г. Бобров [и др.]. – М.: Издательство Академии Наук СССР, 1936.– 762 с.
201. Фомин, В. Н. К вопросу о критериях оптимизации процессов переработки и получения полимерных композиционных материалов / В. Н. Фомин // Доклады Академии наук. – 2004. – Т. 394. – № 6. – С. 778 – 781.
202. Фруентов, Н. К. Лекарственные растения Дальнего Востока / Н. К. Фруентов. – Хабаровск, 1987. – 368 с.
203. Хайнике Г. Трибохимия / Г. Хайнике. – М.: Мир, 1987. – 582 с.
204. Ханина, М.А. Перспективы использования полыни обыкновенной в медицинской практике / М.А. Ханина, Е.А. Серых // Журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2006. - № 1 – 2. – С. 75 – 86.
205. Ханина, М. Г. Элементный состав Agrimonia pilosa Ledeb. / М. Г. Ханина, М. А. Ханина, А. П. Родин // Химия растительного сырья. – 2010. – №2. – С. 99 – 104.

206. Характеристика антирадикальной активности экстрактов из растительного сырья и содержание в них дубильных веществ и флавоноидов / М. Н. Макарова [и др.] // Растительные ресурсы. – 2005. – Т. 41. – вып. 2. – С. 106 – 115.
207. Химический состав и биологические свойства механически активированной крапивы двудомной *Urtica dioica* L. / В. Н. Буркова [и др.]: сб. трудов V всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ». – Уфа. – 2008. – С. 28.
208. Химический состав коры и древесины хвойных и лиственных пород / Т. А. Павлова [и др.] // Гидролизная и лесохимическая промышленность. – 1977. – №4. – С. 3 – 11.
209. Хроматографическое исследование сапонинного состава растительного сырья и фитопрепаратов синюхи голубой / А. А. Мальцева [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2007. – Т. 7. – вып. – 4. – С. 695 – 698.
210. Хроматография: Практическое приложение метода: В 2 – х ч. – Ч. 2. – пер. с англ. / Под ред. Э. Хефтмана. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
211. Шабанова, Н. Ю. Терпеноиды бересты и луба березы Betula pendula Roth. Синтез бетулиновой кислоты: Автореф. дис… канд. хим. наук: 05.21.03 / Н. Ю. Шабанова. – СПб., 2005. – 20 с.
212. Шабанов, П. Д. Эффекты полипренольного препарата ропрен при токсическом поражении печени и головного мозга у крыс: изучение функционального состояния печени, поведения и метаболизма моноаминов в мозге / П. Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2010. – Т.8. – 3. – С. 7 – 30.
213. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / М. Шаршунова, В. Швапц, У. Михалец. – М.: Мир, 1980. – Т. 1. – 288 с., - М.: Мир, 1980. – Т. 2. – 319 с.
214. Шендрик, А. Н. Химия белка. Структура, свойства, методы исследования / А. Н. Шендрик. – Донецк: Норд – пресс, 2004. – 346 с.
215. Шерлок, Ш. Заболевания печени и желчевыводящих путей: Практ Рук.: перев. с анг. / Ш. Шерлок, Дж. Дули. Под ред. З. Г. Апросиной, Н. А. Мухина. – М.: Геотар Медицина, 1999. – 864 с.
216. Шипунов, А. Б. Ключ для определения древесных растений в безлистном состоянии / А. Б. Шипунов. – Режим доступа: http://ir.nmu.org.ua/handle/123456789/71506.
217. Шкурупий, В. А. Туберкулезный гранулематоз . Цитофизиология и адресная терапия / В. А. Шкурупий. – М.: Изд – во РАМН, 2007. – 536 с.

218. Щеголев, П. О. Биологическое действие коры березы измельченной при включении в рацион животных / П. О. Щеголев, В. Ф. Позднякова, К. В. Петрова // Ветеринарная медицина. – 2010. – №1. – С. 47 – 49.
219. Щекатихина, А. С. Гепатопротекторные свойства флаволигнанов / А. С. Щекатихина // Труды Белорус. гос. ун – та. Ч.1. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2009. – Т.4. – С. 27 – 48.
220. Элементный состав аира болотного (Acorus calamus L.) / А. М. Гурьев [и др.] // Химия растительного сырья. – 2003. – №2. – С. 45 – 48.
221. Элементный состав багульника болотного / М. В. Белоусов [и др.] // Химия растительного сырья. – 2002. – №4. – С. 35 – 38.
222. Элементный состав бересты и сухого экстракта / В. В. Иванова [и др.] // Фармация. – 2011. – №3. – С. 27 – 29.
223. Эффективность биологически активной добавки "Тубелон" при комбинированной химиотерапии впервые выявленных больных деструктивным туберкулезом легких / В. В. Ерохин [и др.] // 10 Международный съезд Фитофарм 2006 "Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения", Санкт - Петербург, 27 - 30 июня, 2006. – СПб, 2006. – С. 84 – 85.
224. Юрлова, Л. Ю. Фурокумарины Heracleum sosnowskyi и Heracleum moellendorffii / Л. Ю. Юрлова, Д. М. Черняк, О. П. Кутовая // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2013. – №2. – С. 91 – 93.
225. Якубке, Х. Д. Аминокислоты. Пептиды. Белки / Х. Д. Якубке, Х. Ешкайт. – М.: Мир, 1985. – 82 с.
226. Яцюк, В. Я. Анализ состава веществ первичного синтеза растительного сбора / В. Я. Яцюк, О. А. Елецкая // Российский медико – биологический вестник им. академика И. П. Павлова. – 2009. – № 3. – С.146 – 150.
227. A bicentennial of betulin / E. W. H. Hayek [et al.] // Phytochem. – 1989. – Vol. 28. – №9. – P. 2229 – 2242.
228. Ahmad, N. Green tea polyphenols and cancer: biological mechanisms and practical implications / N. Ahmad, H. Mukhtar // Nutr Rev. – 1999. –Vol. 57. - № 3. – P. 78 – 83.
229. Aiken, C. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals / C. Aiken, C. H. Chen // Trends Mol Med. – 2005. - Vol. 11. - № 1. – P. 31 – 36.
230. Al – Shafi, Sabah M. K. The Inhibitory Effect of Gallic Acid on Human Serum Cholinesterase / Sabah M. K. Al – Shafi, Mohamed J. Al – Azzaw, Methal A. Ali // Iraqi J Pharm Sci. – 2009. –Vol. 18. - № 1. – P. 41 – 43.

231. Analysis of Polyphenolic Antioxidants from the Fruits of Three Pouteria Species by Selected lon Monitoring Liquid Chromatography – Mass Spectrometry/ J. Ma [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2004. – № 52. – P. 5873 – 5878.
232. Anti - inflammatory and antiulcer properties of tannins from Myracrodruon urundeuva Allemão (Anacardiaceae) in rodents / S. M. Souza [et al.] // Phytother Res. – 2007. – Vol. 21. - № 3. – P. 220 – 225.
233. Anti – inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide – stimulated RAW 264.7 cells / S. J. Hwang [et al.] // Inflamm. Res. – 2013. – URL: doi: 10.1007/s00011-013-0674-4.
234. Antioxidant and Anti – Inflammatory Activities of Tannin Fraction of the Extract from Black Raspberry Seeds Compared to Grape Seeds / M. Park [et al.] // Journal of Food Biochemistry. – 2014. –Vol. 38. - № 3. – P. 259 – 270.
235. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives / A. Witaicenis [et al.] // Phytomedicine . – 2014. – Vol. 21. – №3. – P. 240 – 246.
236. Antispasmodic effects of *Prangos ferulacea* acetone extract and its main component osthole on ileum contraction / H. Sadraei [et al.] // Res. Pharm. Sci. – 2013. – Vol. 8. – №2. – P. 137 – 144.
237. Antitumor and immunomodulatory effect of coumarin and 7-hydroxycoumarin against Sarcoma 180 in mice / T. H. Stefanova [et al.] // J. Exp. Ther. Oncol. – 2007. – Vol. 6. – №2. – P. 107 – 115.
238. Apparatus and Selective Solvents for Extraction of Triterpenes from Silver Birch (Betula pendula Roth.) Outer Barc / A. Paze [et al.] // Baltic Forestry – 2014. – Vol. 20. – №1 (38). – P. 88 – 97.
239. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents / I. Baglin [et al.] // Mini Rev Med Chem. – 2003. – Vol. 3. - № 6. – P. 525 –539.
240. Ashok, P. K. Tannins are Astringent / P. K. Ashok, K. Upadhyaya // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. – 2012. –Vol. 1. - № 3. – P. 45 – 50.
241. An updated review of the clinical development of coumarin (1,2 – benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin / M.E. Marshall [et al.] // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 1994. – №120. – P. 39 – 42.
242. Babby, A. Antihyperlipidemic and Hepatoprotective activity of Tannins acid in Streptozotocin induced diabetic rats / A. Babby, C. Elanchezhiyan, S. Suhasini // Current Research in Medicine and Medical Sciences. – 2014. – Vol. 4. – № 2. – P. 9 – 12.

243. Biological and Phytochemical Investigation of Plants XV. Pteryxia terebinthina var. terebinthina (Umbelliferae) / E. B. Thompson [et al.] // J. Nat. Prod. – 1979. – Vol. 42. – №1. – P. 120 – 125.
244. Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by Bacillus megaterium ATCC 13368 / P. Chatterjee [et al.] // Appl Environ Microbiol.– 2000. – Vol. 66. - № 9. – P. 3850 –3855.
245. Casley - Smith, J. R. Reduction of filaritic lymphoedema and elephantiasis by 5,6 - benzo-alpha-pyrone (coumarin), and the effects of diethylcarbamazine (DEC) / J. R. Casley - Smith, S. Jamal //Ann Trop Med Parasitol.. – 1993. – Vol. 87. – №3. – P. 247 – 258.
246. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans / A. Farah [et al.] // J. Nutr. – 2008. – Vol. 138. – №12. – P. 2309 – 2315.
247. Chlorogenic Acid Inhibits Human Platelet Activation and Thrombus Formation / E. Fuentes [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9. – №3. – doi:10.1371/journal.pone.0090699.
248. Cichewicz, R. H. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection / R. H. Cichewicz, S. A. Kouzi // Med Res Rev.– 2004. – Vol. 24. - № 1. – P. 90 – 114.
249. Circulating Matrix Metalloproteinases 1, 2, 9 and Their Inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as Serum Markers of Liver Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis C: Comparison With PIIINP and Hyaluronic Acid / V. Leroy [et al.] // American J. Gastroenterology. – 2004. – Vol. 99. – P. 271 – 276.
250. Collagenase, cathepsin B and cathepsin L gene expression in the synovial membrane of patients with early inflammatory arthritis / G. Cunnane [et al.] // Rheumatology. – 1999. – Vol. 38. – P. 34 – 42.
251. Combination of betulinic acid with cisplatin--different cytotoxic effects in two head and neck cancer cell lines / C. Eder-Czembirek [et al.] // Oncol Rep. – 2005. – Vol. 13. - № 3. – P. 667 –671.
252. Doss, A. Antibacterial activity of tannins from the leaves of Solanum triobatum Linn. / A. Doss, H. Mohammed Mubarack, R. Dhanabalan // Indian Journal of Science and Technology. – 2009. –Vol. 2. - № 2. – P. 41 – 43.
253. Eckerman,Ch. Comparison of solvents for extraction and crystallisation of betulinol from birch bark waste / Ch. Eckerman, R. Ekman // Paperi ja Puu – Pap. och Tra. – 1985. – № 3. – P. 100 – 106.
254. Eesha, B. R. Hepatoprotective activity of Terminalia paniculata against paracetamol induced hepatocellular damage in Wistar albino rats / B. R. Eesha // Asian. Pac. J. Trop. Med. – 2011. – Vol. 4. – №6. – P. 466 – 469.

255. European pharmacopoeia – Supplement 6.2 to the 6 Edition - Strasbourg, 2007. - 3905 p.
256. Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients / K. Patel [et al.] // J. Hepatol. – 2004. – Vol. 41. – № 6. – P. 935 – 942.
257. Evaluation of the anti – inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid / M. D. Santos [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2006. – Vol. 29. – №11. – P. 2236 – 2240.
258. Green Tea Polyphenols: nutraceuticals of modern life / L. R. Juneja [et al.]. – CRC Press, Taylor&Francis Group, 2010. – 337 p.
259. Hadjipavlou – Litina, D. J. The Anti - inflammatory Effect of Coumarin and its Derivatives / D. J. Hadjipavlou - Litina, K. E. Litinas, C. Kontogiorgis // Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry. – 2014. – Vol. 6. – №4. – P. 293 – 306.
260. Helgeland, L. The Action of Vitamin K and Coumarin Anticoagulants / L. Helgeland // Biochemical education. – 1980. –Vol. 8. - № 3. – P. 66 – 69.
261. Huneck, S. Die Darstellung von 19β,28-Epoxy-3-oxo-2-diazo-18αH-oleanan und dessen photo-chemische Umwandlung in A-Nor-Verbindungen / S. Huneck // Chem. Ber. – 1965. – Vol. 98. – №6. – P.1837 – 1857.
262. In-vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of some coumarins and their metal complexes / S. U. Rehman [et al.] // J. Enzyme. Inhib. Med. Chem. – 2005. – Vol. 20. – №4. – P. 333 – 340.
263. In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activities of Chlorogenic Acid against Clinical Isolates of Stenotrophomonas maltophilia including the Ttimethoprim / Sulfamethoxazole Resistant Strain / K. Arunkumar [et al.] // Biomed Res Int . – 2013. – URL: http://dx.doi.org/10.1155/2013/392058.
264. In vitro anti – Leishmania amazonensis activity of the polymeric procyanidin – rich aqueous extract from Syagrus coronate / I. A. Rodrigues [et al.] // Journal of Medicinal Plants Research. – 2011. – Vol. 5. - № 16. – P. 3781 – 3790.
265. Jaasketainen, P. Betulinol and its utilization / P. Jaasketainen // Paperi ja Puu – Pap. och Tra. – 1981. – № 10. – P. 599-603.
266. Kapil, R.S. Chemical constituentsof Diospyros montana Roxb. Part I. Isolation of diospyrin, a new binaphthyl derivative / R. S. Kapil, M. M. Dhaz // J. Scient. and Industr. Res. – 1961. – Vol. 20. – №10. – P. 498 – 500.
267. Kollroser, M. Determination of Coumarin – type Anticoagulants in Human Plasma by HPLC – Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry with an Ion Trap Detector / M. Kollroser, C. Schober // Clinical Chemistry. – 2002. – Vol. 48. – №1. – P. 84 – 91.

268. Kolodziej, H. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells / H. Kolodziej, A. F. Kiderlen // Phytochemistry. – 2005. – № 66. – P. 2056 – 2071.
269. Kostova, I. Coumarins as inhibitors of HIV reverse transcriptase/ I. Kostova // Curr. HIV Res. – 2006. – Vol. 4. – 3. – P. 347 – 363.
270. Kumar, U. Comparative analysis of antioxidant activity and phytochemical screening of some Indian medicinal plants / U. Kumar, V. Prakash// International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2012. –Vol. 4. - № 3. – P. 291 – 295.
271. Laszczyk, M. Triterpentrockenextrakt aus Birkenkork (Betula alba cortex) / M. Laszczyk. - Pforzheim, 2007. – 157 p.
272. Lupane triterpenes and derivatives with antiviral activity / L. A. Baltina [et al.] // Bioorg Med Chem Lett. – 2003. – Vol. 13. - № 20. – P. 3549 –3552.
273. Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Are Markers of Inflammation but Not of the Degree of Fibrosis in Chronic Hepatitis C / S. Reif [et al.] // Digestion. – 2005. – Vol. 71. – №2. – P. 124 – 130.
274. Microbial transformations of two lupine - type triterpenes and anti – tumor - promoting effects of the transformation products / T. Akihisa [et al.] // J Nat Prod. – 2002. – Vol. 65. - № 3. – P. 278 –282.
275. Myers, R. B. The effects of coumarin and suramin on the growth of malignant renal and prostatic cell lines / R. B. Myers, M. Parker, W. E. Grizzle // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. – 1994. – Vol.120. – Suppl. 1. – P. 11 – 13.
276. Nagase, H. Design and characterization of a fluoregenic substrate selectively hydrolyzed by stromelysin 1 (matrix metalloproteinase – 3) / H. Nagase, C. G. Fields, G. B. Fields // J. Biol. Chem. – 1994. – Vol. 269. – №33. – P. 20952 – 20957.
277. Ostwald, W. Lehrbuch der allgemeinen Chemie. Bd. 2. Stochiometrie. Engelmann, Leipzig, 1891. – 1104 p.
278. Pat. 6,815,553 B2 (US), Prior Publication Data 13.06. 2002 Birch Bark Processing and the Isolation of Natural Products from Birch Bark / P. A. Krasutsky [et al.]. – inventors. – Date of Patent. 09.11.2004, Appl. №10/068,272. – 28 p.
279. Pasich, J. Naturaline i polsyntetyczne tenzydy. Cz. VII. Prosty sposob otrzymywania betuliny / J. Pasich, M. Pojda // Farmac pol. – 1974. – Vol. 30. – №8. P. 771 – 772.
280. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin / A. Sami [et al.] // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2006. – №29. – P. 1 – 13.
281. Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review / Sh. Meng [et al.] // Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine. – 2013. – URL: http://dx.doi.org/10.1155/2013/801457.

282. Shankar, S Green tea polyphenols: biology and therapeutic implications in cancer / S. Shankar, S. Ganapathy, R. K. Srivastava // Front Biosci. – 2007. – №12. – P. 4881 – 4899.
283. Study of the betulin enriched birch bark extracts effects on human carcinoma cells and ear inflammation / C. A. Dehelean [et al.] // Chemistry Central Journal. – 2012. – Vol. 6. - № 1. - doi:10.1186/1752-153X-6-137 The electronic version of this article is the complete one and can be found online at:http://journal.chemistrycentral.com/content/6/1/137.
284. Synthesis and pharmacological activity of betulin dinicotinate / O. B. Flekhter [et al.] // Bioorg Khim. – 2002. – Vol. 28. - № 6. – P. 543 –550.
285. Synthesis of Betulinic Acid from Betulin Extract and Study of the Antiviral and Antiulcer Activity of Some Related Terpenoids / O. B. Flekhter [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal / – 2002. – Vol. 36. - № 9. – P. 484 – 487.
286. Synthesis of Novel Alkylaminohydroxypropoxy Coumarin Derivatives / B. L. Thumber [et al.] // An International Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2012. – Vol. 3. – №3. – Suppl. 1. – P. 1774 – 1780.
287. Takeda, S. The choleretic mechanism of coumarin compounds and phenolic compounds / S. Takeda, M. Aburada // J. Pharmacobiodyn. – 1981. – Vol. 4. – №9. – P. 724 – 734.
288. Tannin inhibits HIV – 1 entry by targeting gp41 / L. Lu [et al.] // Acta. Pharmacol. Sin. – 2004. –Vol. 25. - № 2. – P. 213 – 218.
289. Weibel, E. R. Stereological methods / E. R. Weibel. – London: Academic Press, 1979. – 415 p.
290. Weicheselbaum, T. E. Am. J. Clin. Pathol., 1946. - Vol.7. – 40 p.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1**

**№1 №2 бетулин**

**Рисунок 3.1.** Фотография хроматограммы стандартного вещества - бетулина и фракций №1 и 2

Условия хроматографии: пластинка «Sorbfil», система растворителей: бутанол-этанол-аммиак (7:2:5). Проявитель: 25% - раствор кислоты фосфорновольфрамовой в 95% спирте этиловом.

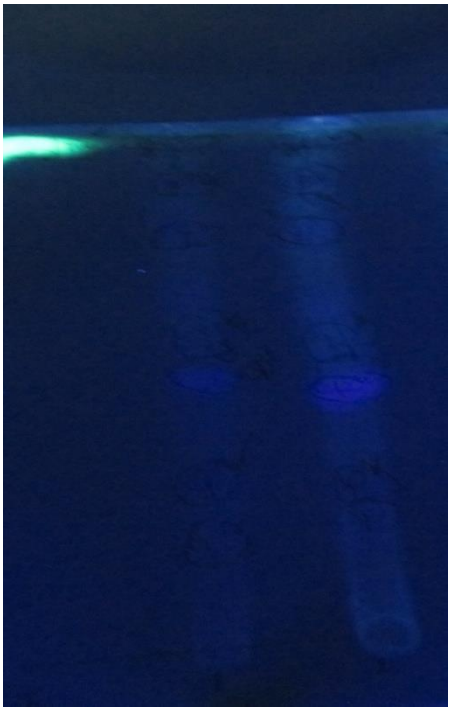


**Рисунок 3.9.** Фотография хроматограммы очищенной суммы кумаринов из образцов бересты №2 и №5, свидетеля – кумарина (С.К.)

*Примечание.* Условия хроматографии: пластинка «Sorbfil», система растворителей: толуол-эфир диэтиловый(4:6), насыщенные 10% кислотой уксусной.

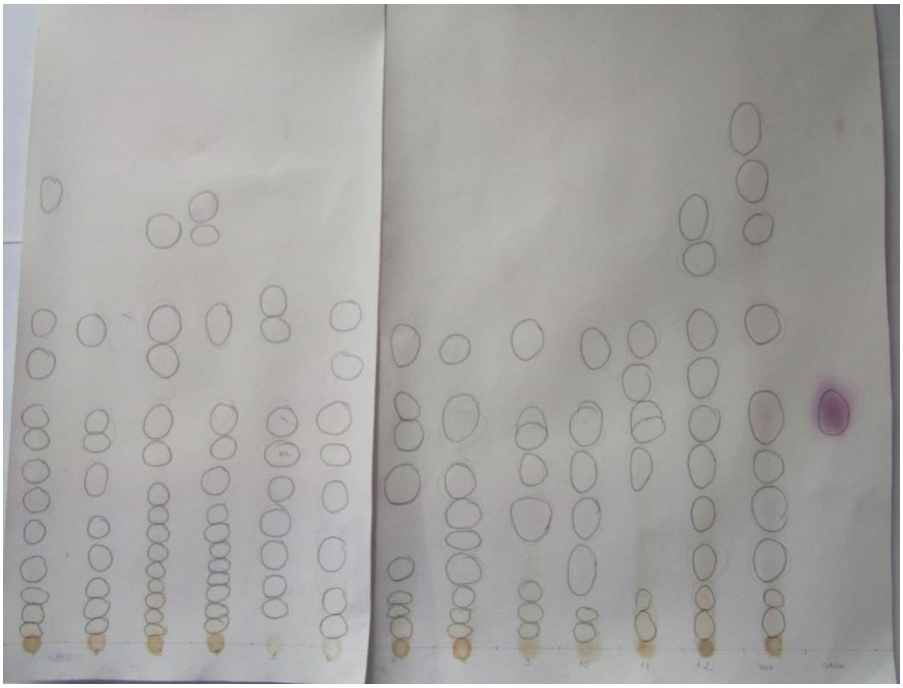


**Рисунок 3.25.** Фотография хроматограммы при исследовании состава суммы аминокислот в образцах бересты

*Условия хроматографии:* бумага «Filtrak» FN6, система растворителей: н-Бутанол-диэтиловый эфир-уксусная кислота-вода (9:6:3:1), система проходит дважды.

| КИБ | МХИБ |
|---|---|

**Рисунок 5.5.** Фотография хроматограммы кумаринов из образцов КИБ и МХИБ, свидетеля – кумарина (С.К.)

*Примечания.* Условия хроматографии: пластинка «Sorbfil», система растворителей: толуол-эфир диэтиловый(4:6), насыщенные 10% кислотой уксусной.

**Рисунок 5.10.** Фотография гидроксикоричных кислот образца МХИБ
*Примечания. Условия хроматографии:* бумага «Filtrak» FN3, система растворителей: 2% водный раствор уксусной кислоты.

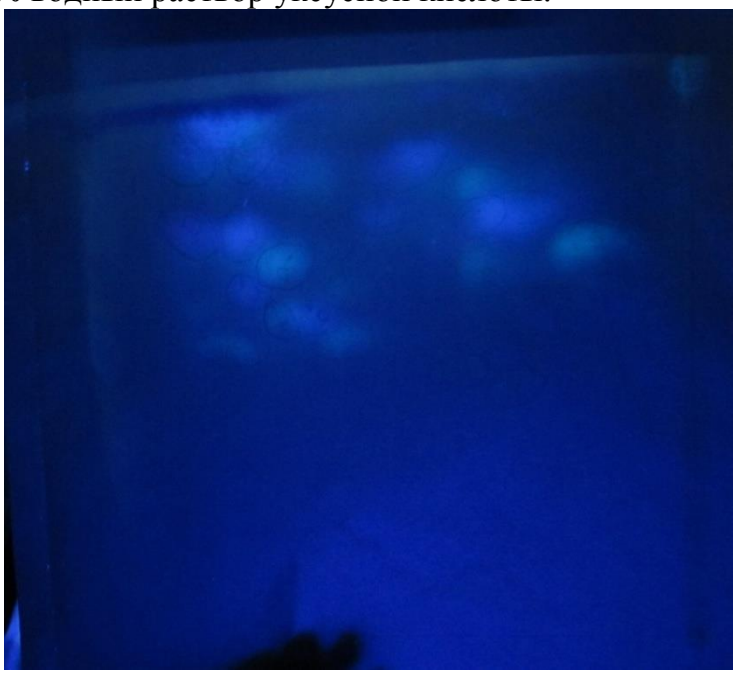


**Рисунок 5.21.** Фотография при исследовании гидроксикоричных кислот образца МХИБ
*Условия хроматографии:* бумага «Filtrak» FN3, система растворителей: 1 направление - 2% водный раствор кислоты уксусной, 2 направление – БУВ (4:1:2).

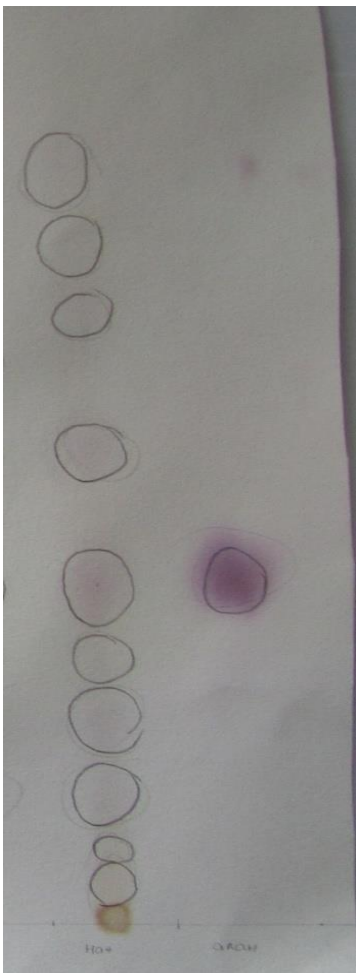


**Рисунок 5.22.** Фотография хроматограммы при исследовании аминокислот образца МХИБ

*Условия хроматографии:* бумага «Filtrak» FN6, система растворителей: н-Бутанол-диэтиловый эфир-уксусная кислота-вода (9:6:3:1), система проходит дважды.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 2**

**«УТВЕРЖДАЮ»**
Проректор по учебной работе,
ГБОУ ВПО НГМУ МЗ РФ
д.м.н., профессор
_____А.И. Бромбин
«16» марта 2015 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

результатов кандидатской диссертации *Лигостаевой Юлии Валерьевны* на тему: «Фармакогностическое исследование бересты и перспективы ее использования в медицине» по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в учебный процесс кафедры фармакогнозии и ботаники государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Комиссия в составе кандидата фармацевтических наук, доцента Величко В.В., кандидата фармацевтических наук, доцента Макаровой Д.Л., кандидата биологических наук, доцента Качкина К.В. подтверждает использование результатов, полученных Лигостаевой Ю.В. в ходе работы над кандидатской диссертацией «Фармакогностическое исследование бересты и перспективы ее использования в медицине», в курсе обучения студентов фармацевтического факультета на кафедре фармакогнозии и ботаники.

Кандидат фармацевтических наук, доцент Величко В.В.
Кандидат фармацевтических наук, доцент Макарова Д.Л.
Кандидат биологических наук, доцент Качкин К.В.

«16» марта 2015 г.

ОТДЕЛ КАДРОВ

ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ
Начальник ОК
«16» 03 2015 г.
ГБОУ ВПО НГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ

630091, г. Новосибирск, ул. Красный проспект, 52

**«УТВЕРЖДАЮ»**
Проректор по учебной работе
ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук,
профессор
_____А.В. Щербатых
«12» марта 2015 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

результатов кандидатской диссертации *Лигостаевой Юлии Валерьевны* на тему: «Фармакогностическое исследование бересты и перспективы ее использования в медицине» по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в учебную работу кафедры фармакогнозии и ботаники государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Иркутского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения Российской Федерации

Комиссия в составе доктора фармацевтических наук Мирович В. М., доктора фармацевтических наук, профессора Федосеевой Г. М., кандидата фармацевтических наук, доцента Горячкиной Е. Г. подтверждает использование результатов, полученных Лигостаевой Ю.В. в ходе работы над кандидатской диссертацией *«Фармакогностическое исследование бересты и перспективы ее использования в медицине»*, в образовательном процессе при обучении студентов фармацевтического факультета специальности «Фармация» на кафедре фармакогнозии и ботаники.

*Доктор фармацевтических наук* *Мирович В. М.*

*Доктор фармацевтических наук, профессор* *Федосеева Г. М.*

*Кандидат фармацевтических наук, доцент* *Горячкина Е. Г.*

664003 г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебно-воспитательной работе ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России,
профессор _____ Алексеева И.В.
«13» марта 2015 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. Наименование внедрения: Фармакогностическое исследование бересты и перспективы ее использования в медицине.
2. Место разработки: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии и ботаники.
3. Авторы: аспирант кафедры фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава России Лигостаева Юлия Валерьевна.
4. Место внедрения: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники.
5. Форма внедрения: результаты исследования использованы в учебном процессе кафедры фармакогнозии с курсом ботаники при проведении практических занятий на 4-5 курсах факультета очного обучения.
6. Эффективность внедрения: результаты проведенного исследования способствуют освоению методик количественного определения тритерпеновых сапонинов и дубильных веществ в бересте, расширению знаний по теме «Гепатопротекторы растительного происхождения» и информируют студентов о научных исследованиях, проводимых в ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава России.

Зав. кафедрой фармакогнозии
с курсом ботаники ГБОУ ВПО ПГФА
Минздрава России, д.фарм.н., профессор Белоногова В.Д.

Доцент кафедры фармакогнозии
с курсом ботаники ГБОУ ВПО ПГФА
Минздрава России, к. фарм. н. Решетникова М.Д.

Доцент кафедры фармакогнозии
с курсом ботаники ГБОУ ВПО ПГФА
Минздрава России, к. фарм. н. Курицын А.В.

614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2

«**УТВЕРЖДАЮ**»
Проректор по учебно-методической
работе ГОУ ВО МО МГОГИ
Кандидат биологических наук, доцент

_____ Г.В.Егорова
«18» марта 2015 г.

## АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов кандидатской диссертации *Лигостаевой Юлии Валерьевны* на тему: «Фармакогностическое исследование бересты и перспективы ее использования в медицине» по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия в учебную работу кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин государственного образовательного учреждения высшего образования Московской области
*«Московский государственный областной гуманитарный институт»*

Комиссия в составе доктора фармацевтических наук, профессора Ханиной М.А., кандидата медицинских наук, доцента Родина А.П, доктора биологических наук, доцента Бабешиной Л.Г. подтверждает использование результатов, полученных Лигостаевой Ю.В. в ходе работы над кандидатской диссертацией *«Фармакогностическое исследование бересты и перспективы ее использования в медицине»)*, в курсе обучения студентов фармацевтического факультета на кафедре фармакологии и фармацевтических дисциплин.

*Доктор фармацевтических наук, профессор* *Ханина М.А.*

*Кандидат медицинских наук, доцент* *Родин А.П.*

*Доктор биологических наук, доцент* *Бабешина Л.Г.*

142611, Московская область, г. Орехово-Зуево, ул. Зеленая, 22

**ПРИЛОЖЕНИЕ 3**