

ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ БЕРЕСТЫ БЕРЕЗЫ BETULA PUBESCENS EHRH

Машенкина Мария Владимировна

студент, Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, РФ, г Москва

Киенская Карина Игоревна

научный руководитель, Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, РФ, г Москва

Буторова Ирина Анатольевна

научный руководитель, Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, РФ, г Москва

OBTAINING EXTRACTIVE SUBSTANCES FROM BIRCH BETULA PUBESCENS EHRH

Аннотация. Исследована микробиологическая чистота березового сырья, на основании которой выявлено, что растительное сырье, используемое при производстве нестерильных лекарственных препаратов - береста *Betula* требует дополнительной термической обработки. Выделены экстрактивные вещества, путем экстракции предварительно измельченной бересты низшими алифатическими спиртами, Бетулин с выходом 40% и субериновые кислоты с выходом 39%. Полученные продукты идентифицированы с использованием физико-химических методов анализа: спектрофотометрии в УФ и видимой областях и ИК-спектроскопии.

Ключевые слова: береста, бетулин, кора березы, низшие алифатические спирты, растительное сырье, субериновые кислоты, экстрактивные вещества.

Введение

Основными химическими компонентами бересты являются экстрактивные вещества (представленные в основном тритерпеновыми сапонинами), суберин и лигнин. Среди других видов растительного сырья береста абсолютный рекордсмен по содержанию биологически активных тритерпеновых соединений [1].

Массовая доля бетулина в бересте колеблется в очень широких пределах (от 10 до 40%), данные колебания зависят от достаточно большого перечня факторов: вид березы, место и условия произрастания, возраст дерева [2]. При этом бетулин одно из самых доступных и ценных природных соединений, с самым широким спектром применения в фармацевтической и косметической промышленности [3]. Это связано с тем, что бетулин не проявляет токсичных свойств, не обладает аллергенным, канцерогенным, кожнораздражающим, кумулятивным, мутагенным, сенсibiliзирующим, тератогенным и эмбриотоксическим действием [4]. Он рекомендован Министерством здравоохранения и социального развития РФ

в качестве БАД.

Впервые бетулин из бересты был выделен методом сублимации, при этом он был сильно загрязнен, выход его был невелик, и составил 23 % [5]. Известны множество способов выделения экстрактивных веществ из бересты методами щелочного гидролиза [5]. Однако, все эти способы имеют ряд недостатков, таких как многостадийность, продолжительность процесса выделения, необходимость применения легковоспламеняемых и токсичных реагентов. Наибольшее влияние на выход экстрактивных веществ оказывает концентрация гидроксида натрия. Зависимость их выхода от концентрации щелочи имеет линейный характер. Увеличение концентрации щелочи от 0,5% до 1,5% приводит к увеличению выхода экстрактивных веществ с 21% до 40%. Концентрация этанола, в выбранном интервале менее существенно влияет на выход экстрактивных веществ. [6].

Немало важно, при выборе способа экстракции необходимо учитывать один из наиболее важных параметров, характеризующих качество любой субстанции и лекарственной формы, - микробиологическую чистоту используемого сырья [7]. Следовательно, при разработке лекарственных средств растительного происхождения, необходимым условием является оценка микробиологических рисков. Учитывая прямую зависимость между безопасностью лекарственного средства и микробиологическими показателями его контаминации, необходимо жестко контролировать качество микробиологических испытаний, которые должны быть максимально точными и валидными [8].

Экспериментальная часть

Для оценки микробиологической чистоты бересты *Betula Pubescens* был выбран модифицированный глубинный метод посева. Готовили испытуемый образец, для этого 5 г бересты мелко измельчали в антисептических условиях и растворяли в 45 мл водного раствора хлорида натрия 0,9 %. Предварительно были подготовлены три разведения исходного образца: 1мл исследуемого образца стерильной пипеткой переносили в пробирку с 9 мл стерильной воды – получали первое разведение 1:10 (10^{-1}). Полученное разведение тщательно перемешивали новой стерильной пипеткой, несколько раз вбирая и пипетку и выпуская из нее полученную суспензию клеток. Затем той же пипеткой отбирали 1 мл полученного разведенного в 10 раз образца и переносили во вторую пробирку с 9 мл стерильной воды – получали второе разведение 1:100 (10^{-2}). Таким же образом готовили третье разведение 1:1000 (10^{-3}). Все операции по приготовлению разведений проводили в асептических условиях (вблизи пламени горелки). Посев полученных разведений, исследуемых образцов проводили глубинным способом: точно отмеренный объем (1,0 мл) соответствующего разведения и вносили на дно сухой стерильной чашки Петри, добавляли 15-20 мл расплавленной и охлажденной до 40 – 45°C питательной среды (L-агар и среда Сабуро). Для равномерного распределения исследуемого материала в питательной среде закрытую чашку Петри с содержимым слегка вращали по поверхности стола и оставляли на горизонтальной поверхности до застывания среды. Наличие дрожжевых грибов и энтеробактерий определяли с помощью экспресс-тестов, на которые наносили 0,5 мл испытуемого образца исходного разведения в антисептических условиях.

Для получения экстрактивных веществ из коры березы, бересту *Betula Pubescens* предварительно измельчали до размеров: длина 20–25 мм, ширина 10–15 мм, толщина 2–5 мм. После измельчения 3 г бересты березы добавляли 40 мл воды, 20 г едкого натра и 60 мл этилового спирта и кипятили в колбе с обратным холодильником в течение 15 мин. Горячий раствор отделяли фильтрованием, фильтрат разбавляли 50-60 мл воды и отгоняли спирт. Выпавший бетулин отфильтровывали, промывали на фильтре горячей водой, высушивали.

С целью очистки бетулин перекристаллизовывали из этилового спирта. Образовавшийся раствор охлаждали при температуре 0°C. Выпавший после охлаждения белый осадок декантировали, затем промывали холодным этиловым спиртом и фильтровали на мембранном фильтре с диаметром пор 25 мкм. Полученный бетулин представляет собой порошок белого цвета с $T_{пл}=247^{\circ}\text{C}$ [4].

Выделение субериновых кислот из измельченной бересты осуществляли обработкой водным раствором едкого натра с последующим кипячением в колбе с обратным холодильником в

течение 20 минут. Реакционную смесь охлаждали до 70°C, добавляли этиловый спирт и кипятили еще в течение 5 минут. Горячий раствор фильтровали, отгоняли спирт, разбавляли водой и фильтрованием отделяли бетулин. После чего полученный раствор подвергали очистки от спирта на роторном испарителе. Осадок суберина отфильтровывали, промывали на фильтре холодной водой до нейтральной реакции. Субериновые кислоты представляют собой порошок бледно – коричневого цвета.

Обсуждение результатов

В ходе исследования микробиологической чистоты растительного сырья – бересты (коры березы) - *Betula Pubescens*, относящейся к клинико-фармакологической группе – растительное сырье для производства нестерильных лекарственных препаратов, согласно Государственной Фармакопеи XIV изд., были получены следующие результаты, представленные в таблице 1.

Таблица 1.

Оценка микробиологической чистоты бересты *Betula Pubescens*

Наименование образца	Количество микроорганизмов, КОЕ/г					
	Общее число аэробных бактерий		Общее число дрожжевых и плесневых грибов		Содержание показателя микробиологической чистоты	
	Норма ОФС.1.2.4.0002.18	Результат исследования	Норма ОФС.1.2.4.0002.18	Результат исследования	Норма ОФС.1.2.4.0002.18	Результат исследования
Субстанция растительного происхождения для производства нестерильных лекарственных препаратов - береста <i>Betula Pubescens</i>	Не более 10 ⁴	2,6 * 10 ³	Не более 10 ²	4,3 * 10 ³	Отсутствия <i>Escherichia coli</i> в 1 г	
					Отсутствия бактерий рода <i>Salmonella</i> 25 г	

С помощью экспресс-тестов (диагностических подложек RIDACOUNTR Biopharm) было обнаружено содержание санитарно-показательных микроорганизмов - бактерии рода *Salmonella* в количестве 100 КОЕ/г.

На основании полученных результатов можно сделать заключение о соответствии исследуемого образца требованиям нормативной документации. Береста *Betula Pubescens* соответствует нормам по содержанию общего числа аэробных бактерий - не более 10⁴ КОЕ/г (2,6 * 10³ КОЕ/ г), для растительного сырья, используемого при производстве нестерильных лекарственных препаратов. По содержанию общего числа дрожжевых и плесневых грибов образец не соответствует нормам, так как составляет более 10² КОЕ в 1 г (4,3 * 10³ КОЕ/г). Также обнаружены бактерии рода *Salmonella*, что не является нормой для растительного сырья, используемого при производстве нестерильных лекарственных препаратов.

Из вышеизложенных факторов справедлив вывод о том, что растительное сырье, используемое при производстве нестерильных лекарственных препаратов - береста *Betula Pubescens* не соответствует ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» [8] и требует дополнительной термической обработки перед применением в качестве растительного сырья, используемого при производстве нестерильных лекарственных препаратов.

В ходе процессов экстракции растительного сырья березы – бересты были получены экстрактивные вещества бетулин с выходом 40% и субериновые кислоты с выходом 39% от веса абсолютной сухой бересты (3 г). После очистки бетулина перекристаллизацией, был получен порошок белого цвета без запаха с выходом 10%.

Таким образом, в данной работе произведена оценка микробиологической чистоты бересты *Betula Pubescens* и возможностей ее использования в качестве растительного сырья для производства нестерильных лекарственных препаратов. Показана возможность упрощения выделения экстрактивных веществ из бересты, путем экстракции предварительно измельченной бересты низшими алифатическими спиртами и экономии времени на отгонке спирта из реакционной массы с помощью роторного испарителя.

Физико-химические исследования бетулина и субериновых кислот. Для подтверждения структуры экстрактивных веществ бересты были использованы следующие физико-химические методы: спектрофотометрия в УФ и видимой областях и ИК-спектроскопия.

В электронном приложении к статье (рис. 1 – 3) представлены спектры экстрактивных веществ в УФ области, снятые на приборе UV-1800 Series. Образец перекристаллизованного бетулина, растворенный в этаноле, имеет шесть пиков при длинах волн 266 нм; 258 нм; 252 нм; 246 нм; 224 нм; 212 нм соответственно (рис. 1). Образцы субериновых кислот, растворенные в воде, имеют по два пика (рис. 2 - 3).

В ИК спектре бетулина наблюдается полоса поглощения, соответствующая валентным колебаниям спиртовой гидроксильной группы $\nu(\text{O-H}) = 3402,43 \text{ см}^{-1}$. Валентные колебания C-H связей CH_2 -групп проявляются при $\nu(\text{C-H})_{\text{as}} 2916,65 = \text{см}^{-1}$, $\nu(\text{C-H})_{\text{s}} = 2854.65 \text{ см}^{-1}$, для CH_3 -групп – при $\nu(\text{C-H})_{\text{s}} = 2877,13 \text{ см}^{-1}$. Деформационным колебаниям C-H связей CH_2 -групп соответствуют полосы поглощения при $\delta(\text{C-H})_{\text{as}} = 1458,18 \text{ см}^{-1}$ (плоскостное «ножничное» колебание), для CH_3 -групп характеристическим является поглощение при $\delta(\text{C-H})_{\text{s}} = 1381,03 \text{ см}^{-1}$.

Характеристической частотой валентных колебаний двойной связи $\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$ являются $\nu(\text{C}=\text{C}) = 1635,64 \text{ см}^{-1}$. Пик при $\nu(\text{C-H}) = 3070,68 \text{ см}^{-1}$ соответствует валентным, а при $\nu(\text{C-H}) = 879,54 \text{ см}^{-1}$ внеплоскостным деформационным колебаниям C-H связей при углероде с двойной связью. Валентное колебание связи C-O определено в области $1075 - 1000 \text{ см}^{-1}$ при $\nu(\text{C-O}) = 1033,85 \text{ см}^{-1}$.

Список литературы:

1. Лигостаева Ю. В. // Фармакогностическое исследование бересты и перспективы ее использования в медицине // дисс. на соискание ученой степени к. ф. н. // Новосибирск: НГМУ, 2015.
2. Кузнецова С. А. // Выделение бетулина из бересты березы и изучение его фармакологических и физико - химических свойств // Химия растительного сырья. – 2013. – №2. – С. 93 – 100.
3. Кузнецов Б.Н. // Совершенствование методов выделения, изучения состава и свойств экстрактов березовой коры // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. - №3. – С. 391 – 400.
4. Кочетова М. В. // Определение биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах методами хроматографии // Успехи химии. – 2007. – Т. 76. – вып. 1. – С. 88 – 100.
5. Кислицын А. Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение // Химия древесины. 1994. №3.
6. Б.Н. Кузнецов, В.А. Левданский, Т.А. Шилкина, С.М. Репях. // Способ получения бетулина // Патент РФ. №2074867. 1997. Бюл. изобр. №7.

7. Семина Н.А., Сидаренко С.В., Ревзан С.П. Методические указания по методам контроля (МУК) 4.2.1980-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. 1980.

8. Государственная Фармакопея РФ XIV изд. // ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» / Москва. 2018.