

УДК 615.454.12'14:547.458].014.22

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВНЕШНЕЙ КОРЫ ДЕРЕВЬЕВ И КУСТАРНИКОВ СЕМЕЙСТВА БЕРЁЗОВЫЕ (BETULACEAE) В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

© 2015 Л.В. Погребняк, А.В. Погребняк

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал
Волгоградского государственного медицинского университета

Поступила в редакцию 26.05.2015

Рассматриваются перспективные направления использования веществ, содержащихся во внешней коре деревьев и кустарников семейства Берёзовые (Betulaceae). Многотоннажная и доступная сырьевая база в сочетании с относительной простотой извлечения (экстрагирования) делают внешнюю кору березы привлекательным объектом для эффективного использования этого природного ресурса. Показаны основные направления использования продуктов глубокой переработки внешней коры березы в качестве потенциальных лекарственных препаратов, вспомогательных веществ при создании твердых и жидких лекарственных форм, а также эффективных косметических средств. Разработана оптимальная технологическая схема выделения бетулина из экстракта внешней коры березы.

Ключевые слова: береза, тритерпеноиды, бетулин

Тритерпеноиды – наиболее распространённые представители класса терпеноидов, которые изучаются уже более 100 лет. В современной классификации практикуется разделение тритерпеноидов на три сложные группы: 1) амбреина и сквалена; 2) тетрациклические тритерпеноиды; 3) пентациклические тритерпеноиды. В свою очередь третья группа, наиболее многочисленная, подразделяется на три подгруппы: группа α -амирина, группа β -амирина и группа лупеола. Ещё в середине XX века была установлена единая биогенетическая схема для всех тритерпеноидов с 30 атомами углерода [1]. Разнообразие физико-химических свойств, особенности структуры, характер и состав углеводной цепи определяют значительный спектр биологической активности тритерпенов [2]. Генетически и по структуре эти соединения близки к физиологически важной группе стероидных гормонов.

На рис. 1 представлены основные структурные формулы тритерпеноидов внешней коры березы, в том числе мажорного компонента – бетулина, свойства которого будут рассматриваться ниже.

О биологической активности бетулина известно с 1899 г., когда отметили антисептические свойства бетулина и рекомендовали его для стерилизации пластырей и бинтов [3]. Бетулин использовали также для снятия зуда. Бетулин, лупеол и бетулиновая кислота идентифицированы в эфирном экстракте из коры *B. utilis*, используемой в

индийской медицине также в качестве антисептика. Учитывая широкий спектр биологического действия тритерпеноидов, ряд российских и зарубежных групп ученых из США, Индии и других стран проводят фармакологическое изучение группы лупана. В ходе работ выяснено, что экстракты из растений, содержащие тритерпеноиды этой группы проявляют противогриппозную, противоязвенную, антистрессорную, ангиопротекторную, антиэкссудативную, антиокислительную виды активности. В настоящее время пентациклические тритерпены ряда лупана, а так же их производные, привлекли внимание ученых-онкологов Химического факультета Государственного Университета Миссисипи, Национального Центра химиотерапевтического лечения рака, Университета Каролины и ряда других НИИ США. Ими было установлено, что бетулиновая кислота, полученная из коры *Ziziphus mauritiana*, обладала антимеланомной цитотоксической активностью без побочных эффектов. В 1972 году в Фармацевтическом колледже университета Аризоны было выяснено, что хлороформный экстракт *Alnus oregona* обладает противоопухолевой активностью по отношению к опухоли Walker256. Были идентифицированы две составляющие экстракта: лупеол и бетулин, которые, по-видимому, обуславливают эту активность. В нашей стране проблемой противоопухолевой активности бетулиновой кислоты и ее производных занимались в Тихоокеанском институте биоорганической химии. Было выяснено, что даммарановые тритерпеноиды способны влиять на природу и скорость деления яйцеклетки морского ежа. Бетулиновая кислота проявляет цитостатическую активность против carcinoma cell line-115 толстой кишки. Бетулин, бетулиновая кислота и лупеол

Погребняк Людмила Владимировна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры технологии лекарств E-mail: pspa2007@yandex.ru

Погребняк Андрей Владимирович, доктор химических наук, профессор кафедры физической и коллоидной химии лекарств

оказывают ингибирующее действие на вирус Эпштейна-Барра. Высокой ингибирующей активностью по отношению к этому вирусу в лимфобластоидных клетках Раджи обладают эритродиол и

бетулиновая кислота. Диацетат бетулина, другие ацилоксипроизводные с $C \leq 18$, тозилоксипроизводные являются активными компонентами противоопухолевых средств.

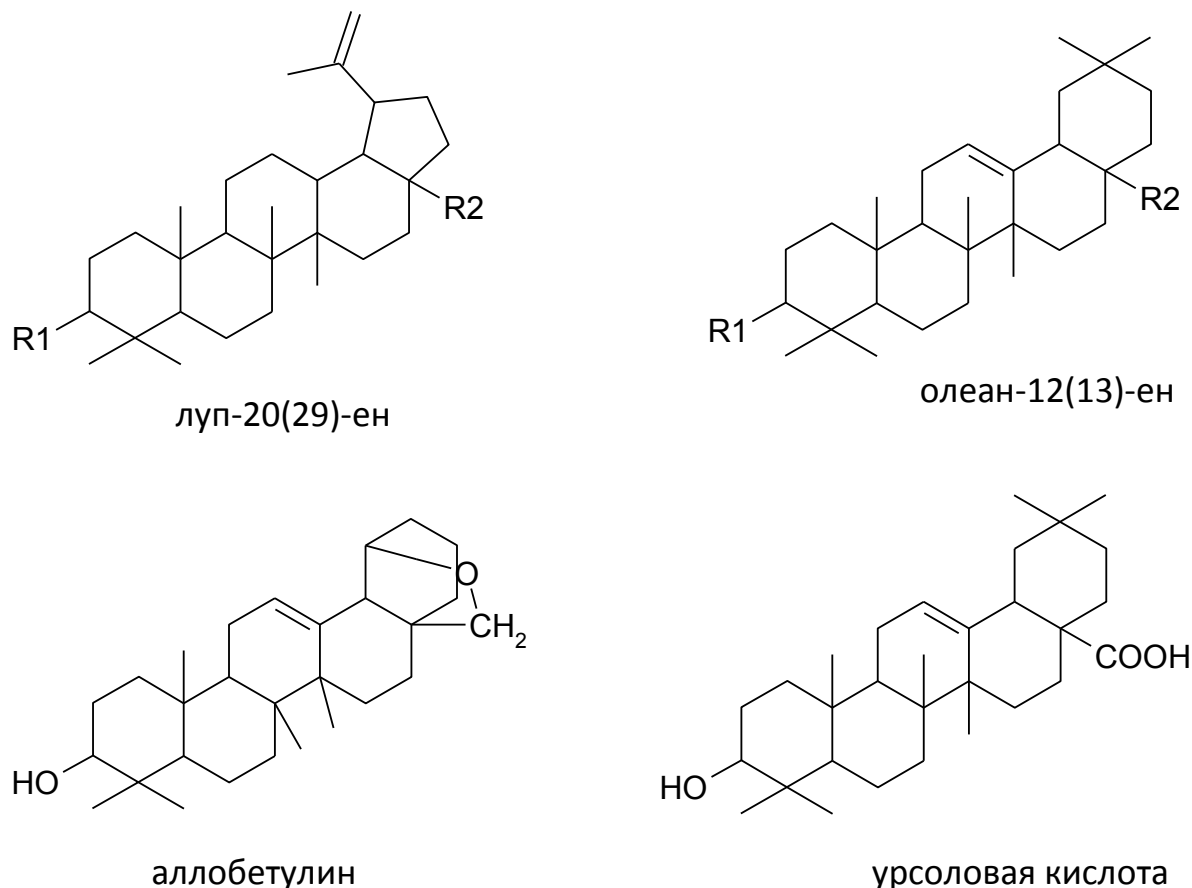


Рис. 1. Общие формулы основных тритерпеноидов внешней коры березы (для бетулина в структуре луп-20(29)-ена $R_1=OH$; $R_2=CH_2OH$)

О биологической активности бетулина известно с 1899 г., когда отметили антисептические свойства бетулина и рекомендовали его для стерилизации пластырей и бинтов [3]. Бетулин использовали также для снятия зуда. Бетулин, лупеол и бетулиновая кислота идентифицированы в эфирном экстракте из коры *B. utilis*, используемой в индийской медицине также в качестве антисептика. Учитывая широкий спектр биологического действия тритерпеноидов, ряд российских и зарубежных групп ученых из США, Индии и других стран проводят фармакологическое изучение группы лупана. В ходе работ выяснено, что экстракты из растений, содержащие тритерпеноиды этой группы проявляют противогриппозную, противовязывную, антистрессорную, ангиопротекторную, антиэкссудативную, антиокислительную виды активности. В настоящее время пентациклические тритерпены ряда лупана, а так же их производные, привлекли внимание ученых-онкологов Химического факультета Государственного Университета Миссисипи, Национального Центра химиотерапевтического лечения рака, Университета Каролины и ряда других НИИ США. Ими было установлено,

что бетулиновая кислота, полученная из коры *Ziziphus mauritiana*, обладала антимеланомной цитотоксической активностью без побочных эффектов. В 1972 году в Фармацевтическом колледже университета Аризоны было выяснено, что хлороформный экстракт *Alnus oregona* обладает противоопухолевой активностью по отношению к опухоли Walker256. Были идентифицированы две составляющие экстракта: лупеол и бетулин, которые, по-видимому, обуславливают эту активность. В нашей стране проблемой противоопухолевой активности бетулиновой кислоты и ее производных занимались в Тихоокеанском институте биорганической химии. Было выяснено, что даммарановые тритерпеноиды способны влиять на природу и скорость деления яйцеклетки морского ежа. Бетулиновая кислота проявляет цитостатическую активность против carcinoma cell line-115 толстой кишки. Бетулин, бетулиновая кислота и лупеол оказывают ингибирующее действие на вирус Эпштейна-Барра. Высокой ингибирующей активностью по отношению к этому вирусу в лимфобластоидных клетках Раджи обладают эритродиол и бетулиновая кислота. Диацетат бетулина, другие

ацилоксипроизводные с $C \leq 18$, тозилоксипроизводные являются активными компонентами противоопухолевых средств.

Американскими учеными было установлено, что производные лупана обладают активностью по отношению к цитопатогенному действию ВИЧ, которая основана на ингибировании образования транскриптазы, что делает возможным использование этих производных для профилактики и лечения СПИДа. Бетулиновая и платановая кислоты из *Syzigium claviflorum* являются ингибиторами репликации ВИЧ, причем эффект тритерпенов направлен на уровне клетки или вируса. Была установлена гипополидемическая, антилитогенная и гепатозащитная активность экстракта, превышающая влияние соответствующих официальных препаратов. Сумма тритерпеноидов также благоприятно воздействовала на жировую дистрофию печени. Бетулин, лупеол и бетулиновая кислота проявляют бактериостатическую активность против *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri* и *Staphylococcus aureus*. Изучено влияние шести тритерпеноидов, в том числе бетулина, его диацетата и аллобетулина, на резистентность организма к повреждающим воздействиям и установлено, что заслуживает внимания гастропротекторная активность бетулина.

Таким образом, анализ литературных данных о биологической активности тритерпеноидов, показывает высокую фармакологическую активность этой группы природных соединений. Помимо биологической активности продукты переработки экстракта внешней коры березы предлагаются нами в качестве вспомогательных веществ при изготовлении ряда лекарственных форм и косметических препаратов.

Изучение товароведческих и технологических характеристик вторичных отходов коры березы. Для научно-обоснованного управления экстракционными процессами в условиях лаборатории или галеново-фармацевтической фабрики необходимо предварительно иметь основные товароведческие и технологические характеристики растительного сырья. Растительное сырье, используемое для получения из него индивидуальных и суммарных препаратов, отличается многообразием морфолого-анатомических и физико-химических свойств. Эти свойства, включающие такие показатели, как насыпная масса, коэффициенты наполнения, вытеснения, увеличения объема, поглощения, образования внутреннего сока, соотношение фаз, количество экстрактивных веществ и др. влияют на проведения экстракционного процесса. Это влияние сказывается на объеме заполнения диффузора, на характере расположения измельченных частиц в диффузоре, на распределении веществ между внешним и внутренним соком, на времени проведения экстракционного процесса, т.е. в конечном итоге на прогнозировании и проведении технологии при извлечении

действующих веществ из растительного сырья. В качестве экстрагента при получении суммы тритерпеноидов (фитокомплекса) из коры березы был избран хлороформ [4]. В пяти партиях сырья были получены результаты, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Содержание экстрактивных веществ и влаги в коре березы (в % массовых единиц)

Содержание экстрактивных веществ	Содержание влаги
35,37	5,40
33,51	5,22
33,84	5,31
33,60	5,02
34,22	5,63

Проведенные ранее исследования показали, что для большинства тритерпеноидов коры березы универсальным растворителем и хорошим экстрагентом является хлороформ. При его отгонке из приемной колбы получалось значительно больше суммарного продукта, чем при экстракции в тех же условиях с помощью ацетона и спирта этилового. Этот факт говорит о том, что хлороформ обладает большей растворяющей (экстрагирующей) способностью по отношению к тритерпеноидам коры березы.

Технология суммарного фитокомплекса из коры березы заключалась в следующем. 0,3 кг высушенного в течение 10 дней и измельченного (размеры частиц 7-10 мм) сырья коры березы помещали в патрон экстрактора аппарата Сокслета. Проводили экстракцию в течение 10 часов до обесцвечивания извлечения в экстракторе. Затем полученное извлечение упаривали на водяной бане до состояния густой массы. Регенерированный хлороформ использовали для получения следующих порций комплекса. Полученный фитокомплекс измельчали до практически однородной массы. Результаты определения бетулина в суммарном экстракте представлены в табл. 2.

Таблица 2. Содержание бетулина в суммарном фитокомплексе из коры березы

Содержание тритерпеноидов в коре березы, %	Содержание бетулина в суммарном фитокомплексе, %
35,60	71,20
36,40	58,00
32,76	51,40
33,36	58,40
36,30	58,60

Нами была проведена сравнительная оценка методов выделения и очистки субстанции бетулина из суммарного хлороформного экстракта. Анализ доступной литературы показал, что имеющиеся

ся способы выделения этого соединения трудоемки и дорогостоящи. Особого внимания, на наш взгляд, заслуживает метод получения бетулина методом прямой кристаллизации из суммарного препарата. При этом используются различные органические растворители (бензол, толуол, гексан, ЧХУ и пр.). Нами была разработана новая методика выделения бетулина путем трехкратной перекристаллизации из бутилового или изопропилового спирта, отличающаяся от известных методов высокой степенью чистоты целевого продукта [5]. Для этого мы растворяли 10,0 суммарного препарата в 100 мл н-бутанола при нагревании и перемешивании. Добавляли 1,0 активированного угля, кипятили в течение 10 мин с обратным холодильником. По истечении времени проводили горячее фильтрование раствора. Фильтрат помещали в прохладное место на 24 часа. Выпавшие кристаллы отделяли от маточного раствора и сушили в сушильном шкафу при 100°C 30 мин. Полученное вещество перекристаллизовывали еще дважды по вышеописанной методике. Тпл. = 252°C. Проводилась проба смешения с заведомо чистым образцом бетулина (Sigma) – депрессии температуры плавления не наблюдалось. Проведена хроматография в тонком слое сорбента (ТСХ). R_f для испытуемого образца и заведомо чистого бетулина составило 0,74. Регистрировались инфракрасный спектр и магнитный резонанс на ядрах H^1 . Полосы поглощения в ИК-области и химические сдвиги в ЯМР-спектре соответствовали таковым для чистого образца бетулина.

Дополнительно к методике выделения чистого бетулина нами разрабатывается и апробируется экстракция растительного сырья двухфазной системой экстрагентов, включающей водно-спиртовую смесь и масло (один из новых методов получения природных комплексов биологически активных веществ). Этот способ позволяет в одной технологической операции извлекать из растительного сырья и гидрофильные, и липофильные БАС, что обеспечивает расширение компонентного состава, большую степень извлечение липофильных веществ и эффективность технологического процесса. Современный рынок косметической продукции в основном представлен препаратами на основе синтетических компонентов, что в сочетании с вышеизложенными проблемами приводит к появлению аллергий, дерматитов, различных воспалительных процессов кожи лица и головы. Использование народной медицины в косметологии позволяет сократить перечень компонентов, получаемых синтетическим путем, и, следовательно, сделать косметические продукты более «дружелюбными» по отношению к человеку. Особенно это касается вспомогательных веществ, позволяющих улучшить потребительские свойства товаров или усилить лечебное действие того или иного действующего вещества.

Береза используется в народной медицине несколько веков, причем именно в косметологии

применение различных частей березы наиболее. Поэтому использование бетулина в качестве вспомогательного вещества, усиливающего терапевтический эффект бифунгина (водной вытяжки чаги, известной своим широким спектром биологического действия) представлялось актуальным. Благодаря внедрению новейших технологических процессов, например, получение липосомальных комплексов, сочетание многих ранее несовместимых компонентов представляется возможным. В настоящее время использование натрия лаурилсульфата и других производных в качестве эмульгаторов вызывает много вопросов. Поэтому нам показалось интересным попытаться поискать замену среди природных веществ, например, использовать в этом качестве бетулин.

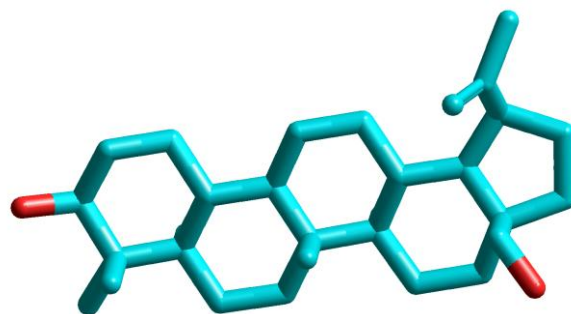


Рис. 2. Результат молекулярного моделирования бетулина методом молекулярной механики в силовом поле MM2 (атомы водорода не показаны).

Результаты молекулярного моделирования бетулина методом молекулярной механики (рис. 2) и последующий расчёт его физико-химических дескрипторов показывают, что молекула обладает следующими свойствами: энергия гидратации 3,81 ккал/моль; коэффициент распределения $\log P$ 7,03; дипольный момент 0,5 Д, что указывает на высокую степень его липофильности.

С целью оценки эмульгирующей способности бетулина измерялось поверхностное натяжение его глицериновых эмульсий. По результатам этих измерений было определено значение го числа гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ). Определение его ГЛБ проводилось с помощью методик Гриффина. Расчет ГЛБ эмульгатора бетулина в соответствии с методикой привел к следующим значениям: по отношению к твин-2 и олеату натрия - 20,2; по отношению к твин-80 и олеату натрия - 20,9; в среднем - 20,55 ~ 20,6.

Выводы: проведенные исследования показали, что бетулин, являясь в высокой степени гидрофобным соединением, эффективно стабилизирует эмульсии типа «вода/масло» (II типа). Принимая во внимание, что получаемый нами шампунь является эмульсией смешанного типа, сочетание бетулина и лаурилсульфата натрия обеспечивает стабильность данного продукта при длительном хранении предположительно до 2 лет. Были изучены несколько составов шампуней с разным

соотношением бетулина и натрия лаурил сульфата. Было доказано, что стабильность лучше всего сохраняется при соотношении 1:1, что позволяет заменить, по крайней мере, половину необходимого для стабилизации лаурилсульфата на менее спорное соединения. Также проводилось исследование противовоспалительной активности шампуня на модели каррагенинового отека. Было установлено, что курсовое применение шампуня сдерживало развитие отека лапы у крыс после субплантарного введения каррагенина. Итоги предварительных исследований показывают, что работы по исследованию и внедрению новых областей применения пентациклических тритерпеноидов и, в частности, бетулина являются весьма перспективными. Особенно это важно с учётом лёгкой доступности, повсеместной распространенности и многотоннажности основного вторичного сырья - внешней коры деревьев и кустарников семейства берёзовые (Betulaceae).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Де Майо, П. Терпеноиды. Пер. с англ. – М.: Изд-во иностр. лит., 1963. С. 289-372, 417-422.
2. Woitke, H.D. Fortschritte in der Erforschung der Triterpensaponine. Eine Übersicht. Teil 2 / H.D. Woitke J.P. Kayser, K. Hiller // Pharmazie. 1970. N 4. S. 213-241.
3. Кислицын, А.Н. Экстрактивные вещества бересты: выделение, состав, свойства, применение // Химия древесины. 1994. №3. С. 3-28.
4. Семенченко, В.Ф. Исследование природных тритерпеноидов в ряду лупана и β-амирина и разработка на их основе новых лекарственных средств: Автореф. Ис. ... д-ра фармац. наук. – Пятигорск, 1993. 40 с.
5. Погребняк, Л.В. Разработка технологии таблетированной лекарственной формы на основе нового полусинтетического производного бетулина, обладающего противотуберкулезной активностью: Дисс. к-та фарм. наук. – Пятигорск, 2005. – 133 с.

**PROSPECTS OF USE THE EXTERNAL BARK OF TREES AND BUSHES OF FAMILY
BIRCH (BETULACEAE) AS THE SOURCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES
AND EXCIPIENTS**

© 2015 L.V. Pogrebnyak, A.V. Pogrebnyak

Pyatigorsk Medical-pharmaceutical institute –branch of
Volgograd State Medical University

The perspective directions of use the substances containing in external bark of trees and bushes of family Birch (Betulaceae) are considered. A large-tonnage and available source of raw materials in combination with relative simplicity of extraction do external bark of a birch the attractive object for effective use of this natural resource. The main directions of use the products of deep processing of external bark of a birch as potential medicines, excipients at creation of firm and liquid dosage forms, and also effective cosmetics are shown. The optimum technological scheme of allocation the betulin from extract of external bark of a birch is developed.

Key words: *birch, triterpenoida, betulin*

*Lyudmila Pogrebnyak, Candidate of Pharmacy, Associate
Professor at the Drugs technology Department. E-mail:
pspa2007@yandex.ru*

*Andrey Pogrebnyak, Doctor of Chemistry, Professor at the
Department of Drugs Physical and Colloid Chemistry*