

УДК 615.322

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ БЕРЕЗЫ (*BETULA PENDULA ROTH.*, *BETULA PUBESCENS EHRH.*)

© *К.И. Ровкина*^{1,2*}, *С.В. Кривошеков*¹, *А.М. Гурьев*¹, *М.С. Юсубов*^{1,2}, *М.В. Белоусов*^{1,2}

¹ Сибирский государственный медицинский университет Минздрава
России, Московский тракт, 2, Томск, 634055 (Россия), e-mail: rki91@bk.ru

² Национальный исследовательский Томский политехнический
университет, пр. Ленина, 30, Томск, 634050 (Россия)

Целью данного исследования являлась разработка комплексной методики экстракции и очистки полисахаридов из листьев березы (*Betula pendula Roth.*, *Betula pubescens Ehrh.* сем. березовых – *Betulaceae*) (ПСfВ). В качестве критериев оценки влияния исследуемых параметров на получение целевых веществ изучали следующие характеристики: выход ПСfВ (метод гравиметрии), содержание белка (спеттрофотометрический метод), молекулярно-массовое распределение (высокоэффективная эксклюзионная хроматография) и степень очистки от низкомолекулярных примесей (НМП) (ИК-спектроскопия). В ходе эксперимента на различных стадиях получения ПСfВ установлены оптимальные параметры: степень измельчения сырья – 1.2–3 мм, рН экстрагента (вода очищенная с рН=6.5–7.0), соотношение сырье : экстрагент (1 : 20), температура экстракции (50 °С), температура и кратность упаривания (50 °С; в 4 раза), соотношение концентрат : этанол (1 : 3) и метод очистки от НМП (ультрафильтрация). Результатом данной работы являлась оптимизированная методика получения ПСfВ, позволяющая достичь высокого выхода без потери качества продукта (минимально допустимое содержание низкомолекулярных примесей при наибольшем содержании высокомолекулярных фракций). Данная методика является основой для разработки лабораторного регламента получения активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов из листьев березы.

Ключевые слова: полисахариды, *Betula pendula Roth.*, *Betula pubescens Ehrh.*, экстракция, молекулярно-массовое распределение.

Введение

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются приоритетной проблемой здравоохранения вследствие абсолютных показателей заболеваемости и смертности [1]. Основным фактором риска развития ССЗ, в частности атеросклероза, являются высокий уровень общего холестерина, триглицеридов и холестерина липопротеинов низкой плотности в крови. Ранее показано [2–5], что природные полисахариды (ПС), экстрагированные из растений и микроорганизмов, обладают выраженной гиполлипидемической активностью и могут быть рассмотрены в качестве новых лекарственных кандидатов для регуляции липидного обмена.

Ровкина Ксения Игоревна – аспирант,
e-mail: rki91@bk.ru

Кривошеков Сергей Владимирович – младший научный
сотрудник, e-mail: ksv_tsu@mail.ru

Гурьев Артем Михайлович – доктор фармацевтических
наук, руководитель центра внедрения технологий,
e-mail: titan-m@mail.ru

Юсубов Мехман Сулейман оглы – доктор химических
наук, директор исследовательской школы химических
и биомедицинских технологий, e-mail: yusubov@mail.ru

Белоусов Михаил Валерьевич – доктор фармацевтических
наук, заведующий кафедрой фармацевтического анализа,
e-mail: mvb63@mail.ru.

На базе СибГМУ проводится доклиническое исследование ПС, выделенных из листьев березы (ПСfВ), с целью разработки нового гиполлипидемического препарата [6]. Ввиду разнообразия природных ПС разработка унифицированной процедуры их выделения, а также очистки не представляется возможной [7]. Целью данного исследования являлась разработка методики экстракции и очистки полисахаридов березы, позволяющей обеспечить высокий

* Автор, с которым следует вести переписку.

выход целевых веществ при сохранении удовлетворительных показателей качества, предъявляемых к фармацевтическим субстанциям.

Наиболее распространенным способом выделения ПС из растительного сырья является экстракция водным растворителем при нагревании, с последующим сгущением экстракта и осаждением с помощью органических растворителей (этанол, ацетон). В процессе осаждения вместе с ПС могут осажаться сорбированные на них низкомолекулярные примеси (НМП), поэтому необходима стадия очистки продукта от последних.

Таким образом, для выделения ПС из листьев березы использована предварительная схема, состоящая из следующих основных стадий: экстракция, упаривание экстракта, центрифугирование, спиртовое осаждение, очистка от НМП, сушка конечного продукта.

Экспериментальная часть

В качестве сырья использовали листья березы (*Betula pendula Roth.*, *Betula pubescens Ehrh.* сем. березовых – *Betulaceae*), заготовленные в окрестностях города Томска в июне 2017 г. ПС выделяли из листьев березы по ранее предложенной нами схеме [8]. Для определения влияния параметров на выход и показатели качества конечного продукта провели ряд экспериментов, в каждом из которых изменяли только один параметр. В качестве критериев оценки влияния исследуемых параметров использовали.

Выход (% от количества исходного растительного сырья) – экономический показатель, обуславливающий рациональность технологического подхода и конечную себестоимость готового продукта. Определяли гравиметрически в пересчете на воздушно-сухое сырье в процентах (X) и вычисляли по формуле:

$$X (\%) = \frac{m_{\text{ПСfВ}} \times 100}{m_{\text{нав}} \times (100 - W)} \times 100,$$

где $m_{\text{ПСfВ}}$ – масса высушенных полисахаридов березы, г; $m_{\text{нав}}$ – масса навески сырья, г; W – влажность сырья.

Содержание белка определяли методом Лоури [9].

Молекулярно-массовое распределение ПСfВ характеризует степень деградации макромолекулы, определяли методом эксклюзионной хроматографии на хроматографе Ultimate 3000 с рефрактометрическим детектированием [10].

Степень очистки от НМП определяли методом ИК-спектроскопии на ИК-Фурье спектрометре ФСМ 1201. Для контроля степени очистки от НМП, а именно низкомолекулярных фенольных соединений, получены ИК-спектры образцов, очищенных различными методами. Для каждого спектра рассчитаны отношения оптических плотностей при волновых числах 1610 см^{-1} (валентные колебания ароматических C=C) к 1630 см^{-1} (валентные колебания –C=O карбоксильной группы) [11–12].

Определение оптимальных параметров экстрагирования ПСfВ (стадия экстракции). Измельчение сырья с целью ускорения процесса диффузионного извлечения ПС является одной из важных стадий подготовки сырья. Листья березы измельчали и разделяли на фракции путем просеивания через сита с различными диаметрами отверстий (1.2 мм, 2 мм, 3 мм, 10 мм). Получали 5 фракций сырья различного размера (менее 1.2 мм – фракция 1; 1.2–2 мм – фракция 2; 2–3 мм – фракция 3; 3–10 мм – фракция 4; более 10 мм – фракция 5).

Известно, что в растительном сырье ПС могут находиться в связанном виде (например, с ионами металлов) и не полностью извлекаются нейтральным растворителем [13]. Для повышения растворимости кислых ПС используют подкисление экстрагента, например, добавлением хлористоводородной кислоты, слабые концентрации которой способствуют разрушению солей кислых галактуронанов и переходу их в растворенное состояние. Однако наличие сложноэфирных связей в полимерных звеньях галактуроновой кислоты в случае ПСfВ резко снижает кислотные свойства и способность ПС к связыванию с ионами металлов во внутриклеточном матриксе, что оказывает существенное влияние на динамику его извлечения из растительного сырья в зависимости от pH экстрагента. Поэтому в данном исследовании в качестве экстрагента использовали воду очищенную, подкисленную хлористоводородной кислотой до значения pH 2.0, 4.0, 6.0, и воду очищенную без добавления хлористоводородной кислоты pH 6.5–7.0.

При экстракции растительного сырья соотношение сырье: экстрагент оказывает существенное влияние на выход готового продукта и в меньшей степени влияет на его качественные характеристики [14]. В связи с этим проводили эксперимент по изучению влияния различных соотношений экстрагента (воды

очищенной) и растительного сырья (листьев березы) на выход ПСfВ. В эксперименте исследовали следующие значения соотношений – сырье : экстрагент: 1 : 10; 1 : 20; 1 : 30; 1 : 40.

Для определения влияния температурного режима экстракции на выход и качество ПСfВ проведено сравнение этих показателей при температуре 50 °С, 90 °С и комнатной температуре (22 °С).

Определение оптимальных параметров упаривания экстракта. При изучении влияния температуры упаривания на выход и качество ПСfВ проводили экстракцию 3 серий листьев березы. Полученные извлечения упаривали на роторном испарителе при 30 °С (Р = 25 мбар), 50 °С (Р = 25 мбар) и 90 °С (Р = 75 мбар).

При изучении влияния кратности упаривания экстракта на выход ПСfВ получали 4 серии экстракта листьев березы, которые упаривали на роторном испарителе при температуре 50 °С в 5, 4, 3, 2 раза.

Определение оптимальных параметров спиртового осаждения. В эксперименте изучали влияние концентрат : этанол в соотношениях 1 : 2, 1 : 3 и 1 : 4.

Определение оптимальных параметров очистки от низкомолекулярных примесей. Макромолекулы ПС в растворе существуют в виде аморфного клубка, заполняемого растворенными в воде НМП (например, фенольными и терпеновыми соединениями), соосаждаемыми вместе с ПС, что требует дальнейшей очистки от последних [15, 16]. Комплекс используемых методов очистки включает промывку осадка ПС этанолом (M1), ультрафильтрацию (M2) и диализ растворов ПС (M3) [17]. Для этого получили три образца ПСfВ (каждый в трех повторностях). Для очистки брали навески образцов (по 10 г), полученных на стадии осаждения после центрифугирования.

M1. Образец помещали в круглодонную колбу и добавляли 150 мл 96% этанола. Смесь перемешивали в течение 1 ч, при температуре водяной бани 50 °С. Далее осадок отфильтровывали и растворяли в воде очищенной.

M2. Образец растворяли в 500 мл воды, раствор подвергали ультрафильтрации в течение 8 ч с использованием кассеты VivaFlow 50, 5.000 MWCOPES с перистальтическим насосом MASTERFLEX L/S Economy, с периодическим добавлением воды очищенной в исходный образец и определением электропроводности фильтрата.

M3. Образец растворяли в 100 мл воды, полученный раствор помещали в диализный мешок Thermo Scientific Snake Skin с размером пор 3.5 кДа. Раствор ПСfВ диализировали против воды очищенной в течение 3 суток со сменой среды каждые 8 ч и контролем ее электропроводности с помощью кондуктометра Mettler Toledo FG3.

После очистки образцы замораживали при -40 °С. Подготовленный образец лиофилизировали в течение 48 ч на лиофильной сушке IShin Bio Base MCFD 8508. Наиболее простой и доступный метод сушки, используемый при получении полисахаридов, – это сушка горячим воздухом. При этом серьезные физико-химические изменения структуры полисахарида делают его малопривлекательным для исследователей. Окисления в процессе сушки возможно избежать использованием вакуума. Однако использование вакуумной сушки не предотвращает распада термолабильных связей [18]. Таким образом, в процессе лиофилизации максимально сохраняется химическая структура полисахаридов, а следовательно, и биологическая активность [19].

Обсуждение результатов

В первую очередь, параметром, значительно влияющим на выход и качество ПС, является степень измельчения сырья, результаты его изучения представлены в таблице 1.

Из данных таблицы 1 следует, что оптимальной степенью измельчения растительного сырья является диапазон 1.2–3 мм, так как разница между 2 и 3 фракцией является незначительной.

Фракции образцов (табл. 2), экстрагируемых водой очищенной, имели молекулярную массу выше, чем у образцов, полученных при подкислении (рН 2, 4, 6), что свидетельствует о более мягких условиях их выделения и как следствие, менее выраженной деградации исходной макромолекулы. Содержание примесей белка увеличивалось со снижением рН экстрагента (табл. 2), что возможно связано с активацией кислых гидролаз и разрывом кислотолабильных связей, вызывающих разрушение клеточной стенки [20].

Таблица 1. Влияние размера частиц сырья на выход ПСfВ

Фракция	Выход ПСfВ, %
1 (менее 1.2 мм)	1.86±0.09
2 (1.2–2 мм)	3.01±0.33
3 (2–3 мм)	2.86±0.21
4 (3–10 мм)	2.53±0.22
5 (более 10 мм)	1.99±0.16

Таблица 2. Влияние pH экстрагента на выход и молекулярную массу фракций ПСfВ

Значение pH экстрагента	Выход ПСfВ, %	Молекулярно-массовое распределение (ММР)		Содержание белка, %
		W, %	M _w , кДа	
2.0	2.77±0.19	3.16	307.1	2.10±0.12
		75.14	179.2	
		21.7	141.3	
4.0	2.99±0.23	11.65	366.4	1.91±0.10
		62.90	361.1	
		25.45	144.0	
6.0	2.90±0.24	26.04	480.3	1.36±0.07
		55.15	313.4	
		18.81	161.0	
6.5–7.0	2.91±0.25	26.13	422.5	1.24±0.05
		63.07	371.0	
		10.80	161.0	

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что значение pH экстрагента не оказывает существенного влияния на суммарный выход ПСfВ, но влияет на его качество – содержание белка и ММР. Оптимальным является использование экстрагента с pH=6.5–7.0.

Следующим изучаемым параметром, влияющим на выход ПСfВ, является соотношение сырье : экстрагент. Из результатов эксперимента (табл. 3) следует, что при соотношениях сырье : экстрагент 1 : 20; 1 : 30 и 1 : 40 не наблюдается значимых различий в выходе конечного продукта, а использование 10 частей экстрагента к 1 части сырья приводит к снижению выхода. Таким образом, оптимальное соотношение сырье : экстрагент – 1 : 20, так как использование соотношений сырье : экстрагент 1 : 30 и 1 : 40 не приводит к увеличению выхода продукта и усложняет технологического процесс, связанный с упариванием большего количества растворителя.

Температурный режим экстракции может оказывать существенное влияние на выход и качество конечного продукта [21]. Изменение температуры может повлечь за собой как увеличение выхода продукта, так и его снижение за счет разрушения ПС при высоких температурных значениях.

Из полученных данных (табл. 4) следует, что экстракция при комнатной температуре приводит к меньшему выходу ПСfВ со снижением молекулярных масс. По-видимому, это обусловлено снижением интенсивности экстракции макромолекул из растительного сырья за счет замедления процессов смачивания и растворения, тогда как для низкомолекулярных веществ эти процессы проходят наиболее легко. При использовании высоких температур экстракции (90 °С) происходит частичная деградация макромолекул ПС, что может оказывать влияние как на ММР, так и суммарный выход ПС. Таким образом (табл. 4), оптимальным значением температуры экстрагента, используемым для получения ПСfВ, является 50 °С.

Упаривание экстракта является критической стадией процесса получения ПСfВ, так как ПС на данном этапе подвергаются длительному воздействию повышенной температуры. С одной стороны, это может повлечь за собой снижение выхода конечного продукта и деградацию макромолекул ПС, что может привести к потере биологически активных свойств [22]. С другой стороны, сгущение экстракта при низкой температуре сопровождается большими временными и другими ресурсными затратами. В связи с этим проведен экспериментальный подбор оптимального значения данного параметра, результаты приведены в таблице 5.

Для образцов (табл. 5), упаренных при 90 °С, значения ММР заметно ниже, что свидетельствует об ухудшении качества готового продукта. Из данных эксперимента следует, что упаривание экстракта при температуре 30 °С не приводит к снижению выхода и качества готового продукта, но значительно увеличивает время проведения процесса (в 1.8 раза). При 50 °С также не происходит уменьшения выхода и снижения качества ПСfВ, однако значительно сокращается продолжительность процесса по сравнению с упариванием при 30 °С.

Таблица 3. Влияние соотношения сырье : экстрагент на выход ПСfВ

Соотношение сырье : экстрагент	Выход ПСfВ, %
1 : 10	1.68±0.11
1 : 20	2.87±0.22
1 : 30	2.91±0.23
1 : 40	2.88±0.18

Таблица 4. Влияние температурного режима экстракции на выход и молекулярные массы фракций ПСfВ

Температура экстракции, °С	Выход ПСfВ, %	Молекулярно-массовое распределение	
		W, %	M _w , кДа
22	1.75±0.14	15.76	347.1
		46.32	151.5
		23.41	107.2
		14.5	56.2
50	3.21±0.27	21.97	415.3
		62.14	366.5
		15.89	143.3
90	2.90±0.21	15.28	419.9
		42.43	336.4
		30.48	272.0
		11.81	135.3

Таблица 5. Влияние температуры упаривания экстракта на выход и молекулярные массы фракций ПСfВ

Температура упаривания экстракта, С	Продолжительность упаривания, мин.	Выход ПСfВ, %	Молекулярно-массовое распределение	
			W, %	M _w , кДа
30	105	3.35±0.25	33.20	407.3
			55.89	328.8
			10.9	129.2
50	58	3.33±0.29	30.94	391.5
			43.67	338.9
			25.39	117.4
90	42	3.32±0.26	0.98	409.3
			76.55	341.8
			22.45	125.5

Таким образом, оптимальная температура упаривания экстракта при получении ПСfВ – 50 °С.

От кратности упаривания экстракта напрямую зависит эффективность последующей стадии спиртового осаждения. Недостаточное сгущение экстракта может привести к увеличению потерь конечного продукта и необоснованно высокому расходу осаждающего агента (этанола). При 5-кратном упаривании экстракта, в испарительной колбе наблюдалось пленкообразование и залипание экстракта, что не позволило провести следующие технологические стадии и получить стандартизованный конечный продукт. Поэтому данная серия была исключена из эксперимента, и сделан вывод о нецелесообразности 5 кратного упаривания экстракта. Различие в выходе ПСfВ при разной кратности упаривания экстракта незначительно и составляет 0.1–0.2% (табл. 6).

Упаривание экстракта в 4 раза приводит к меньшему расходованию осаждающего агента – этилового спирта, что снижает затраты на получение конечного продукта. Таким образом, упаривание экстракта целесообразно проводить в 4 раза.

Выделение ПС из сгущенного водного извлечения (концентрата) проводят методом осаждения. Соотношение количеств концентрата и осаждающего агента оказывает влияние на эффективность технологии – так, недостаточное количество этанола может привести к неполному осаждению ПСfВ из водного раствора, а использование избытков этанола ведет к необоснованному удорожанию конечного продукта. Кроме того, избыточная концентрация осаждающего агента может привести к соосаждению балластных низкомолекулярных веществ, которые потребуют введения дополнительных стадий очистки на дальнейших этапах технологического процесса, что также усложняет технологию и делает ее менее рациональной.

Из данных эксперимента (табл. 7) следует, что использование соотношения концентрат : этанол 1 : 2 приводит к значительно меньшему выходу ПСfВ. Значения ММР образцов, полученных осаждением в соотношении концентрат : этанол – 1 : 3 и 1 : 4, различаются незначительно и разница в выходе не существенна, однако соотношение 1 : 3 является более рациональным по затратам осаждающего агента (этанола).

Таблица 6. Влияние кратности упаривания экстракта на выход ПСfВ

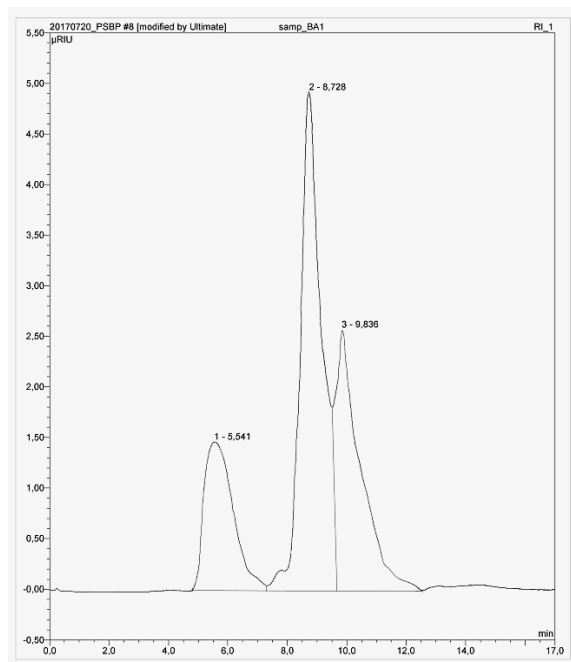
Кратность упаривания экстракта, раз	Выход ПСfВ, %
4	3.35±0.32
3	3.27±0.29
2	3.17±0.24

При анализе спектров ПСfВ, полученных при использовании различных методов очистки от НМП, выявлено, что наименее эффективным методом является промывка горячим этанолом, отношение 1610/1630 составило 0.70. Отношение 1610/1630 для образца, очищенного методом диализа, составило 0.56. Наиболее эффективным методом очистки от НМП является ультрафильтрация: отношение 1610/1630 – 0.41. Дополнительным преимуществом данного метода являются высокая скорость очистки при одновременном концентрировании и отсутствие затрат на растворители для очистки, что делает метод экономически выгодным и сокращает время выделения ПС.

Разработанная методика заключается в следующем: навеску измельченных листьев березы (1.2–3 мм) массой 25 г смешивают с 500 мл воды очищенной и нагревают на водяной бане при температуре 50 °С в течение 2 ч. Извлечение упаривают в 4 раза на роторном испарителе (50 °С и 25 мбар). К полученному густому извлечению медленно при перемешивании прибавляют 96% этанол (соотношение экстракт : этанол – 1 : 3). Полученный влажный осадок растворяют в воде, очищают и концентрируют с помощью кассет VivaFlow 50, 5.000 MWCOPES. Раствор ПСfВ замораживают при -40 °С, высушивают с помощью лиофильной сушки при давлении менее 0.001 Атм в течение 2 суток.

Таблица 7. Влияние соотношения концентрат : этанол на выход и молекулярную массу фракций ПСfВ

Соотношение концентрат : этанол	Выход ПСfВ, %	Молекулярно-массовое распределение	
		W, %	Mw, кДа
1 : 2	2.04±0.17	75.12	401.2
		20.80	333.1
		4.08	110.9
1 : 3	3.39±0.26	19.48	404.7
		48.46	347.1
		32.06	183.2
1 : 4	3.41±0.27	24.56	406.6
		38.82	321.8
		36.62	189.4



Хроматограмма образца ПСfВ, полученного по оптимизированной методике

Выводы

Таким образом, оптимизированная методика позволяет получать ПСfВ с высоким выходом (3.41±0.27%) и удовлетворительными характеристиками по молекулярно массовому распределению (рис.) и очистке от НМП. Данная методика является основой для разработки лабораторного регламента получения активной фармацевтической субстанции на основе полисахаридов из листьев березы.

Список литературы

1. Yeates K., Lohfeld L., Sleeth J., Morales F., Rajkotia Y., Ogedegbe O. A global perspective on cardiovascular disease in vulnerable populations // *Can. J. Cardiol.* 2015. Vol. 31. N9. Pp 1081–1093. DOI: 10.1016/j.cjca.2015.06.035.
2. Nakamura M., Miura S., Takagaki A., Nanjo F. Hypolipidemic effects of crude green tea polysaccharide on rats, and structural features of tea polysaccharides isolated from the crude polysaccharide // *Int. J. Food SciNutr.* 2017. Vol. 68. N3. Pp. 321–330. DOI: 10.1080/09637486.2016.1232376.
3. Hebi M., Eddouks M. Hypolipidemic activity of *Tamarix articulata* Vahl. in diabetic rats // *J. Integr. Med.* 2017. Vol. 15. N6. Pp. 476–482. DOI: 10.1016/S2095-4964(17)60361-3.
4. Korolenko T.A., Johnston T.P., Machova E., Bgatova N.P., Lykov A.P., Goncharova N.V., Nescakova Z., Shintyapina A.B., Maiborodin I.V., Karmatskikh O.L. Hypolipidemic effect of mannans from *C. albicans* serotypes A and B in acute hyperlipidemia in mice // *International Journal of Biological Macromolecules.* 2018. Vol. 107, Part B. Pp. 2385–2394. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.111.
5. Shituleni A., Gan F., Nido S.A., Mengistu B.M., Khan A.Z., Liu Y., Huang K. Effects of yeast polysaccharide on biochemical indices, antioxidant status, histopathological lesions and genetic expressions related with lipid metabolism in mice fed with high fat diet Bioactive // *Carbohydrates and Dietary Fibre.* 2016. Vol. 8. N2. Pp. 51–57. DOI: 10.1016/j.bcdf.2016.10.001.
6. Шукшина О.Г. Гиполипидемический эффект и клеточный состав перитониального экссудата после действия полисахаридов у крыс с дислипидемией // Сборник материалов I Всероссийская научная студенческая конференция с международным участием Медико-биологические науки: достижения и перспективы. Томск, 2011. С. 127–129.
7. Aspinall G.O. *The Polysaccharides.* Academic Press, 1983. 518 p. DOI: 10.1016/C2013-0-10317-0.
8. Хасанова С.Р., Кривошеков С.В., Кудашкина Н.В., Гурьев А.М., Ровкина К.И., Белоусов М.В. Компонентный состав полисахаридного комплекса листьев *Crataegus sanguinea* (Rosaceae) из флоры Республики Башкортостан // *Растительные ресурсы.* 2015. Т. 51, вып. 3. С. 397–406.
9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Pholin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. Pp. 265–275.
10. Rovkina K.I., Krivoshechekov S.V., Guryev A.M., Yusubov M.S., Belousov M.V. Water-Soluble Polysaccharides of Alfalfa (*Medicago sativa* (Fabaceae)) of Flora of Krasnoyarsk Krai // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. Vol. 44. N7. Pp. 854–859. DOI: 10.1134/S1068162018070105.
11. Сальникова Е.Н., Калинкина Г.И., Дмитрук С.Е. Химическое исследование флавоноидов полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.), п. Сиверса (*A. Sieversiana* Willd.) и п. якутской (*A. Jacutica* Drob.) // *Химия растительного сырья.* 2001. №3. С. 71–78.
12. Красочко П.А., Капуцкий Ф.Н., Красочко И.А., Зубец О.В., Аладьева Т.А. Характеристика ИК-спектров адьювантов на основе полисахаридов растительного происхождения // *Ученые Записки УО ВГАВМ.* 2012. Т. 48, вып. 2, ч. I. С. 84–87.
13. Domozych D.S., Sørensen I., Popper Z.A., Ochs J., Andreas A., Fangel J.U., Pielach A., Sacks C., Brechka H., Ruisi-Besares P., Willats W.G.T., Rose J.K.C. Pectin Metabolism and Assembly in the Cell Wall of the Charophyte Green Alga *Penium margaritaceum* // *Plant.* 2014. Vol. 165. N1. Pp. 105–118. DOI: 10.1104/pp.114.23625.
14. Левин Б.Д., Федюлин А.С. Влияние гидромодуля на выход биологически активных веществ // *Вестник КрасГАУ.* 2007. №2. С. 266–269.
15. Liu J., Bai R., Liu Y., Zhang X., Kan J., Jin C. Isolation, structural characterization and bioactivities of naturally occurring polysaccharide–polyphenolic conjugates from medicinal plants – A review // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 107, Part B. Pp. 2242–2250. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.097.
16. Sukhov B.G., Pogodaeva N.N., Kuznetsov S.V., Kupriyanovich Yu.N., Yurina G.V., Selivanova D.S., Pistavka A.A., Dzhioev Yu.P., Popkova S.M., Rakova E.B., Medvedeva P.A., Trofimov B.A. Prebiotic effect of native noncovalent arabinogalactan – flavonoid conjugates on bifidobacteria // *Russ. Chem. Bull.* 2014. Vol. 63. N9. Pp. 2189–2194. DOI: 10.1007/s11172-014-0718-0.
17. Шиповская А.Б. Методы выделения и физико-химические свойства природных полисахаридов. Саратов, 2015. 64 с.
18. Fan L.P., Li J.W., Deng K.Q., Ai L.Z. Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum* // *Carbohydr Polym.* 2012. Vol. 87. Pp. 1849–1854. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.10.018.
19. Li X.Y., Wang L., Wang Y., Xiong Z.H. Effect of drying method on physicochemical properties and antioxidant activities of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides // *Process Biochem.* 2016. Vol. 51. Pp. 1100–1108. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.05.006.
20. Warrand J., Michaud P., Miller G., Courtois D., Ralainirina R. Large-scale purification of water-soluble polysaccharides from flaxseed mucilage, and isolation of new anionic polymer // *Chromatographia.* 2003. Vol. 58. Pp. 331–335. DOI: 10.1365/s10337-003-0060-4.
21. Lu X., Li N., Qiao X., Qiu Z., Liu P. Effects of thermal treatment on polysaccharide degradation during black garlic processing // *LWT.* 2018. Vol. 95. Pp. 223–229. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.04.059.

22. Jiang Y., Qi X., Gao K., Liu W., Li N., Cheng N. Relationship between molecular weight, monosaccharide composition and immunobiologic activity of Astragalus polysaccharides // *Glycoconj. J.* 2016. Vol. 33. Pp. 755–761. DOI: 10.1007/s10719-016-9669-z.

Поступила в редакцию 4 апреля 2019 г.

После переработки 7 мая 2019 г.

Принята к публикации 15 мая 2019 г.

Для цитирования: Ровкина К.И., Кривощек С.В., Гурьев А.М., Юсубов М.С., Белоусов М.В. Разработка методики получения полисахаридов из листьев березы (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.) // *Химия растительного сырья*. 2019. №3. С. 23–31. DOI: 10.14258/jcprgm.2019035420.

Rovkina K.I.^{1,2*}, Krivoshechekov S.V.¹, Guriev A.M.¹, Yusubov M.S.^{1,2}, Belousov M.V.^{1,2} DEVELOPMENT OF METHODS FOR OBTAINING POLYSACCHARIDES FROM BIRCH LEAVES (*BETULA PENDULA ROTH.*, *BETULA PUBESCENS EHRH.*)

¹Siberian state medical university, Moscovski Trakt, 2, Tomsk, 634050 (Russia), e-mail: rki91@bk.ru

²National Research Tomsk Polytechnic University, pr. Lenina, 30, Tomsk, 634050 (Russia)

The development of a complex technique for the extraction and purification of polysaccharides from birch leaves (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.) (PSfB) was the purpose of this study. The following characteristics were used as criteria for evaluating the effect of the parameters studied on the production of target substances: yield of PSfB (gravimetric method), protein content (spectrophotometric method), molecular weight distribution (high performance exclusion chromatography) and degree of purification from low molecular weight impurities (LMWI) (IR) spectroscopy). During the experiment, the optimal parameters were determined at various stages of obtaining the PSfB: degree of raw materials grinding – 1.2–3 mm, pH of the extractant (purified water with pH=7), the ratio of raw materials : extractant (1 : 20), extraction temperature (50 °C), temperature and degree of evaporation (50 °C; 4 times), the ratio of concentrate : ethanol (1 : 3) and the method of purification from the LMWI (ultrafiltration). The result of this work is an optimized method for obtaining PSfB, allowing to achieve high yield without loss of product quality (minimum allowable content of low molecular weight impurities with the highest content of high molecular weight fractions). This technique is the basis for the development of laboratory regulations for obtaining an active pharmaceutical substance based on polysaccharides from birch leaves.

Keywords: polysaccharides, *Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh., Extraction, molecular weight distribution.

References

- Yeates K., Lohfeld L., Sleeth J., Morales F., Rajkotia Y., Ogedegbe O. *Can. J. Cardiol.*, 2015, vol. 31, no. 9, pp. 1081–1093, DOI: 10.1016/j.cjca.2015.06.035.
- Nakamura M., Miura S., Takagaki A., Nanjo F. *Int. J. Food Sci Nutr.*, 2017, vol. 68, no. 3, pp. 321–330, DOI: 10.1080/09637486.2016.1232376.
- Hebi M, Eddouks M. *J. Integr. Med.*, 2017, vol. 15, no. 6, pp. 476–482, DOI: 10.1016/S2095-4964(17)60361-3.
- Korolenko T.A., Johnston T.P., Machova E., Bgatova N.P., Lykov A.P., Goncharova N.V., Nescakova Z., Shintyapina A.B., Maiborodin I.V., Karmatskikh O.L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, vol. 107, part B, pp. 2385–2394, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.111.
- Shituleni A., Gan F., Nido S.A., Mengistu B.M., Khan A.Z., Liu Y., Huang K. *Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2016, vol. 8, no. 2, pp. 51–57, DOI: 10.1016/j.bcdf.2016.10.001.
- Shukshina O.G. *Sbornik materialov I Vserossiyskaya nauchnaya studencheskaya konferentsiya s mezhdunarodnym uchastiyem Mediko-biologicheskiye nauki: dostizheniya i perspektivy*. [Collection of materials I All-Russian Scientific Student Conference with international participation Biomedical Sciences: achievements and prospects]. Tomsk, 2011, pp. 127–129. (in Russ.).
- Aspinall G.O. *The Polysaccharides*, Academic Press, 1983, 518 p. DOI: 10.1016/C2013-0-10317-0.
- Khasanova S.R., Krivoshechekov S.V., Kudashkina N.V., Gur'yev A.M., Rovkina K.I., Belousov M.V. *Rastitel'nyye resursy*, 2015, vol. 51, no. 3, pp.397–406. (in Russ.).
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. *J. Biol. Chem*, 1951, vol. 193, pp. 265–275.
- Rovkina K.I., Krivoshechekov S.V., Guryev A.M., Yusubov M.S., Belousov M.V. *Russ. J. Bioorg. Chem*, 2018, vol. 44, no. 7, pp. 854–859, DOI: 10.1134/S1068162018070105.
- Sal'nikova Ye.N., Kalinkina G.I., Dmitruk S.Ye. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2001, no. 3, pp. 71–78. (in Russ.).

* Corresponding author.

12. Krasochko P.A., Kaputskiy F.N., Krasochko I.A., Zubets O.V., Alad'yeva T.A. *Uchenyye Zapiski UO VGAVM*, 2012, vol. 48, no. 2, part I, pp. 84–87. (in Russ.).
13. Domozych D.S., Sørensen I., Popper Z.A., Ochs J., Andreas A., Fangel J.U., Pielach A., Sacks C., Brechka H., Ruisi-Besares P., Willats W.G.T., Rose J.K.C. *Plant*, 2014, vol. 165, no. 1, pp. 105–118, DOI: 10.1104/pp.114.23625.
14. Levin B.D., Fedyulin A.S. *Vestnik KrasGAU*, 2007, no. 2, pp. 266–269. (in Russ.).
15. Liu J., Bai R., Liu Y., Zhang X., Kan J., Jin C. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, vol. 107, part B, pp. 2242–2250, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.097.
16. Sukhov B.G., Pogodaeva N.N., Kuznetsov S.V., Kupriyanovich Yu.N., Yurina G.V., Selivanova D.S., Pistavka A.A., Dzhioev Yu.P., Popkova S.M., Rakova E.B., Medvedeva P.A., Trofimov B.A. *Russ. Chem. Bull.*, 2014, vol. 63, no. 9, pp. 2189–2194, DOI: 10.1007/s11172-014-0718-0.
17. Shipovskaya A.B. *Metody vydeleniya i fiziko-khimicheskiye svoystva prirodnykh polisakharidov*. [Isolation methods and physicochemical properties of natural polysaccharides]. Saratov, 2015. 64 p. (in Russ.).
18. Fan L.P., Li J.W., Deng K.Q., Ai L.Z. *Carbohydr. Polym.*, 2012, vol. 87, pp. 1849–1854, DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.10.018.
19. Li X.Y., Wang L., Wang Y., Xiong Z.H. *Process Biochem.*, 2016, vol. 51, pp. 1100–1108, DOI: 10.1016/j.procbio.2016.05.006.
20. Warrand J., Michaud P., Miller G., Courtois D., Ralainirina R. *Chromatographia*, 2003, vol. 58, pp. 331–335, DOI: 10.1365/s10337-003-0060-4.
21. Lu X., Li N., Qiao X., Qiu Z., Liu P. *LWT*, 2018, vol. 95, pp. 223–229, DOI: 10.1016/j.lwt.2018.04.059.
22. Jiang Y., Qi X., Gao K., Liu W., Li N., Cheng N. *Glycoconj. J.*, 2016, vol. 33, pp. 755–761, DOI: 10.1007/s10719-016-9669-z.

Received April 4, 2019

Revised May 7, 2019

Accepted May 15, 2019

For citing: Rovkina K.I., Krivoshchekov S.V., Guriev A.M., Yusubov M.S., Belousov M.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 3, pp. 23–31. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2019035420.

