

О.А. Воронова¹, Е.В. Плотников¹, С.С. Калиева², Е.Е. Нурпейис¹,
Е.А. Мамаева¹, А.К. Ташенов², А.А. Бакибаев³

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Россия;

²Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан;

³Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия
(E-mail: miledi_2212@mail.ru)

Исследование антиоксидантной активности представителей тритерпеноидов лупанового и олеанового ряда методом вольтамперометрии

В связи с пристальным вниманием исследователей к изучению биологической активности природных соединений и их синтетических производных разработка простых и экспрессных методов для решения этих задач становится особо актуальной. Вследствие значительной стоимости и трудоемкости проведения экспериментов *in vivo* в последнее время более широкое применение находят физико-химические методы анализа, адаптированные под измерение определенного вида биологической активности. К подобным методам относятся электрохимические методы, область применения которых распространяется на электрохимические процессы, протекающие с участием электроактивных частиц. Несмотря на многообразие известных методов, литературные сведения о способах и результатах измерения антиоксидантной активности пентациклических тритерпеноидов ограничены несколькими сообщениями. С целью расширения возможностей применения электрохимических методов для исследования биологической активности указанного ряда соединений, нами было проведено определение их антиоксидантной активности вольтамперометрическим методом. В работе сравнивались показатели антиоксидантной активности следующих представителей лупанового и олеанового рядов: бетулина, диацетата бетулина и аллобетулина. Показано, что диацетат бетулина проявляет более выраженную антиоксидантную активность. Сделано предположение о том, что двойная связь в изопрופןильном фрагменте выступает как наиболее активный центр, взаимодействующий с радикалами кислорода. Бетулин показывает среднюю антиоксидантную активность, поскольку в его структуре присутствуют три конкурентных и менее активных при окислении реакционных центра: кратная связь и ОН-группы в 3- и 28- положениях. Наименьшую антиоксидантную активность проявляет аллобетулин с менее активной гидроксильной группой в 3-м положении.

Ключевые слова: пентациклические тритерпеноиды, бетулин, диацетат бетулина, аллобетулин, антиоксидантная активность, катодная вольтамперометрия.

В настоящее время существенное внимание исследователей уделяется изучению биологической активности природных соединений, в том числе тритерпеноидов и их синтетических производных [1–4].

Известно, что тритерпеноиды лупанового ряда обладают широким спектром фармакологической активности: противовирусной, противоязвенной, противоопухолевой, капилляроукрепляющей [5–9]. Следует отметить, что ценность тритерпеноидов лупанового ряда заключается в их доступности в природе, что выгодно для внедрения в фармацевтическую промышленность. К числу наиболее доступных тритерпеноидов относится бетулин — 3 β ,28-дигидрокси-20(29)-лупен, содержащийся в значительных количествах (до 40 %) во внешней коре березы [10].

Наряду с повышенным интересом к бетулину, неуклонно растет внимание специалистов к его производным, обладающим ценными свойствами. Так, диацетат бетулина — 3 β ,28-диацетокси-луп-20(29)-ен — проявляет желчегонную и гиполлипидемическую активность [5, 11], аллобетулин — 3 β -гидрокси-19 β ,28-эпокси-18 α -олеан и его производные обладают противовирусным и антифибринным действиями [12, 13].

Ранее в работе [14] была определена антиоксидантная активность (АОА) некоторых производных бетулина и аллобетулина с использованием амперометрического метода. Максимальное значение АОА было установлено для 3,28-ди-О-циннамата бетулина. Авторы работы [15] проводили изучение АОА диацетата бетулина в экспериментах *in vitro* и *in vivo*; на основании полученных данных было сделано предположение, что диацетат бетулина выступает в роли ловушки для активных форм кислорода, а также способен либо стимулировать синтез антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы и каталазы, либо непосредственно влиять на их активность.

Недостатками экспериментов *in vivo* являются высокая стоимость расходных материалов и трудоемкость анализа. Поэтому в последнее время более широкое применение находят физико-химические методы анализа (ФХМА), которые позволяют не только быстро и качественно провести идентификацию сложных органических веществ, но и определить параметры некоторых биологически значимых свойств органических соединений. Среди таких методов анализа особое место занимают электрохимические методы, область применения которых распространяется на процессы, связанные с участием электроактивных частиц. Однако, несмотря на многообразие модификаций известных методов, литературные сведения о способах и результатах измерения АОА пентациклических тритерпеноидов ограничены несколькими сообщениями. Следовательно, разработка чувствительных, экспрессных и селективных методов анализа для этого ряда соединений до сих пор остается актуальной задачей.

Целью исследования является сравнение антиоксидантной активности ряда пентациклических тритерпеноидов — бетулина, диацетата бетулина и аллобетулина на основе применения вольтамперометрического метода.

Оборудование и реагенты

Бетулин выделяли из предварительно измельченной бересты *Betula pendula* по методу [16]. Диацетат бетулина и аллобетулин получали по методам, описанным в работах [15] и [17] соответственно. Согласно литературным данным, пентациклические тритерпеноиды практически не растворимы в воде, поэтому в качестве растворителя для приготовления стандартных растворов бетулина, диацетата бетулина и аллобетулина нами был выбран этанол. Использование данного растворителя позволяет получать водно-органические смеси со значительным содержанием тритерпеноидов без расслоения. Основной стандартный раствор получали растворением навески субстанции массой 0,02 г в этаноле объемом 10 мл.

Исследования проводили на универсальном вольтамперометрическом анализаторе «ГА-2» (ООО «Томьаналит», г. Томск, Россия). Условия проведения эксперимента: развертка потенциала от 0,0 до -0,8 В с линейной скоростью 30 мВ/с, время перемешивания и успокоения раствора 10 с и 20 с соответственно, трехэлектродная ячейка с индикаторным ртутно-пленочным электродом и хлорид-серебряными электродами как электрод сравнения и вспомогательный электрод, фоновый электролит 0,1 М спиртовый раствор перхлората натрия.

Методика проведения эксперимента

Антиоксидантные свойства бетулина, диацетата бетулина и аллобетулина определялись методом катодной вольтамперометрии по известной методике, основанной на использовании процесса восстановления кислорода [18].

Методика определения активности исследуемых веществ заключается в регистрации через определенный промежуток времени вольтамперограмм тока электровосстановления кислорода в отсутствие и в присутствии анализируемого вещества в электрохимической ячейке.

Показателем антиоксидантной активности исследуемого образца является уменьшение предельного тока электровосстановления кислорода по своему абсолютному значению. Предполагается, что это связано с взаимодействием исследуемых веществ с кислородом и его активными радикалами на поверхности индикаторного электрода.

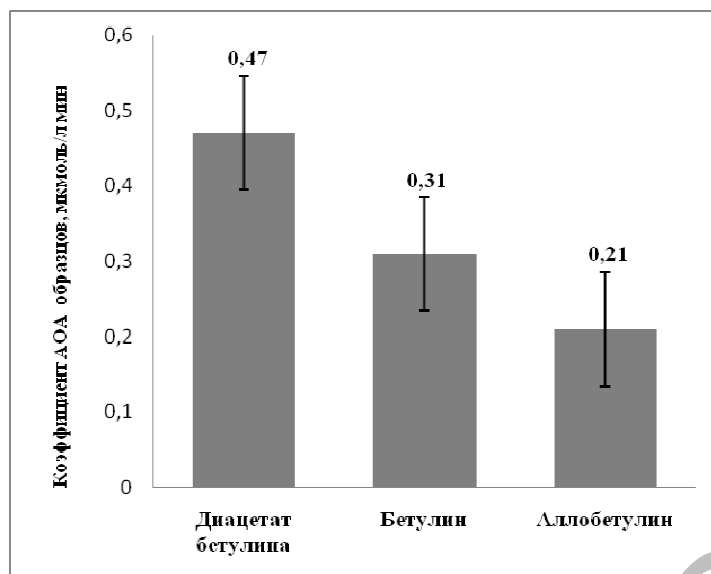
Коэффициент антиоксидантной активности образцов, K , мкмоль/(л·мин), рассчитывался по формуле

$$K = \frac{C_{O_2}}{t} \left(1 - \frac{I_i}{I_o} \right),$$

где C_{O_2} — концентрация кислорода в исходном растворе без вещества, мкмоль/л; I_i — текущее значение предельного тока ЭВ O_2 , мкА; I_o — значение предельного тока ЭВ O_2 в отсутствие вещества в растворе, мкА; t — время протекания процесса, мин.

Статистическая обработка результатов проводилась по стандартному алгоритму [19].

На диаграмме представлены результаты измерения антиоксидантной активности бетулина, диацетата бетулина и аллобетулина.



$C_{раб} = 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л; относительное стандартное отклонение $Sr = 0,07$ (диацетат бетулина), $0,05$ (бетулин), $0,06$ (аллобетулин)

Диаграмма. Коэффициенты антиоксидантной активности ряда пентациклических тритерпеноидов по отношению к ЭВ O_2

Для диацетата бетулина и аллобетулина были предложены маршруты их взаимодействия с активными формами кислорода (АФК) на поверхности индикаторного электрода (рис. 1, 2).

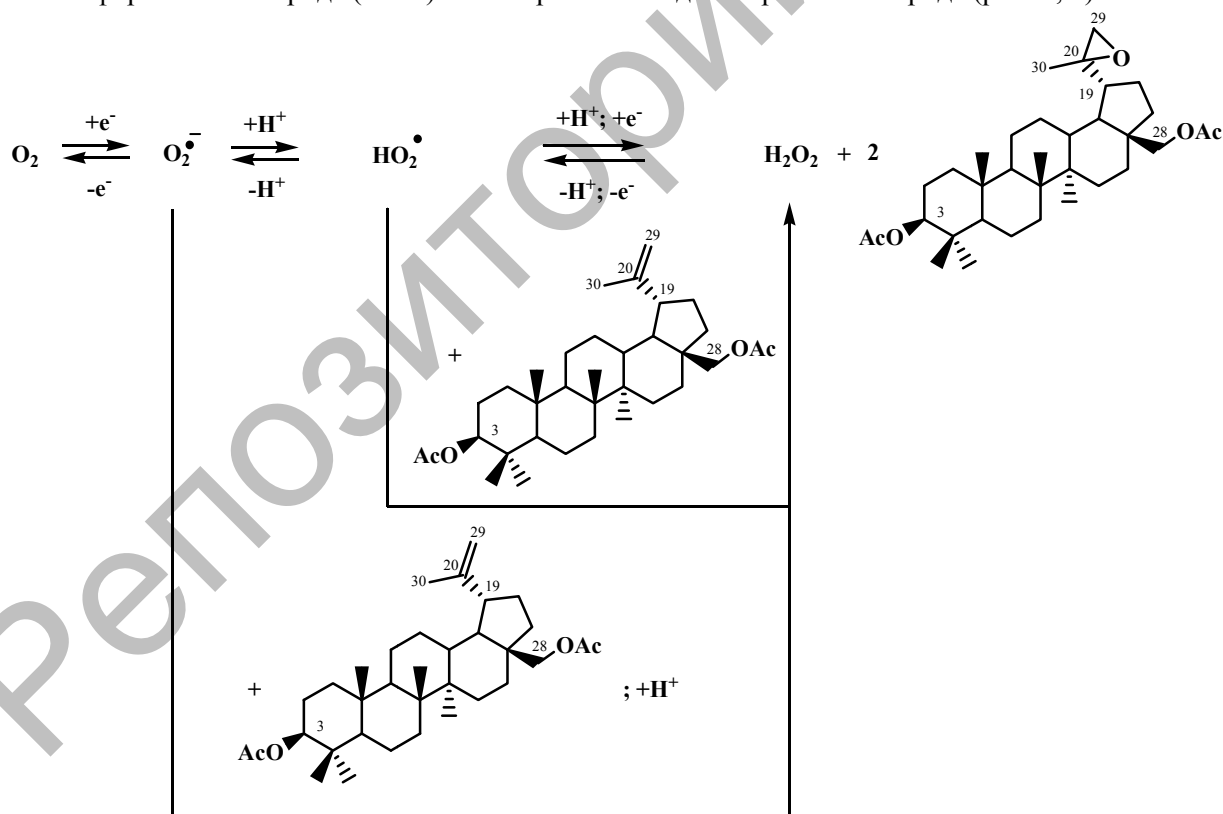


Рисунок 1. Предполагаемый маршрут взаимодействия АФК и диацетата бетулина на поверхности индикаторного электрода

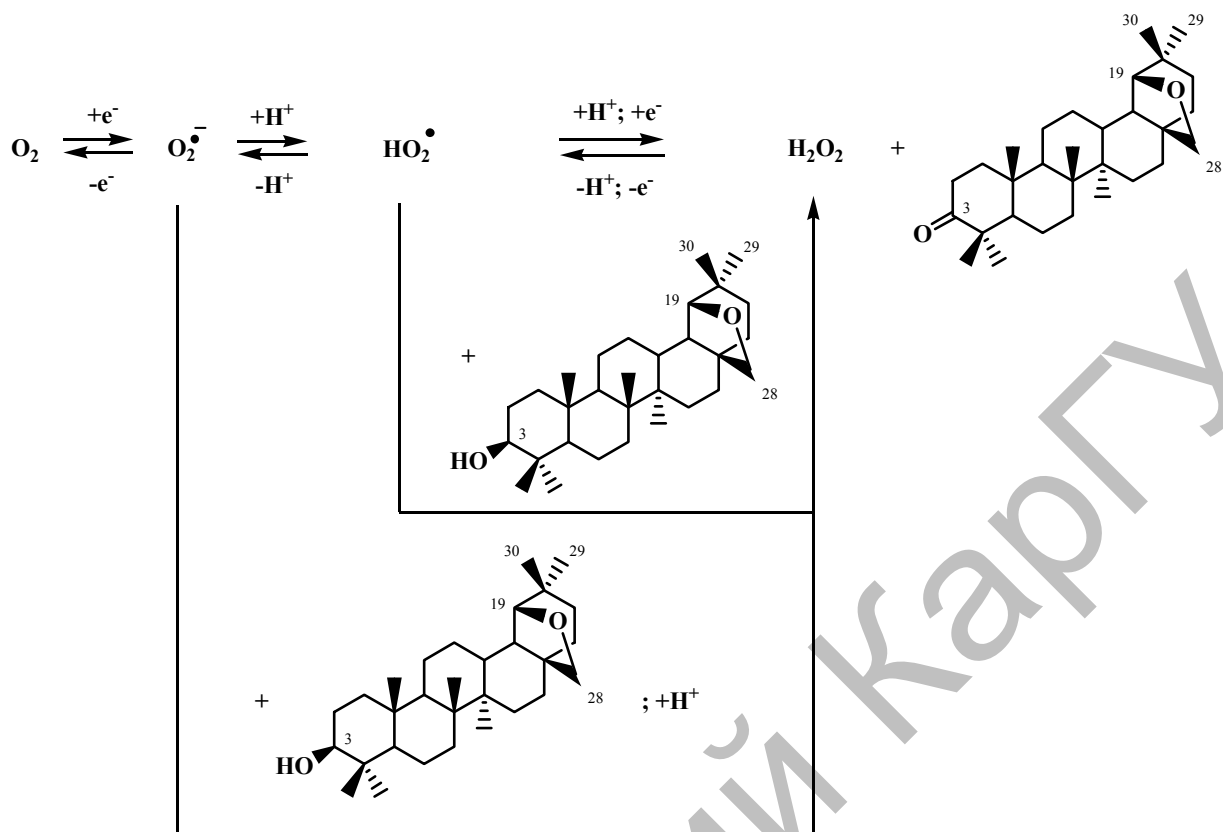


Рисунок 2. Предполагаемый маршрут взаимодействия АФК и аллобетулина на поверхности индикаторного электрода

Результаты экспериментов показали, что диацетат бетулина имеет наибольшую антиоксидантную активность по сравнению с другими исследуемыми веществами (бетулином и аллобетулином). Мы полагаем, что такой выраженный эффект ингибирования окисления связан с наличием в структуре диацетата бетулина наиболее активной двойной связи, которая подвергается более легкому окислению, чем в самом бетулине. Аргументом в пользу нашего предположения является то, что в 3-м и 28-м положении у диацетата бетулина гидроксильные группы защищены ацильными заместителями, что делает существенно затруднительным окисление по данным позициям. Бетулин показывает среднюю антиоксидантную активность, поскольку в его структуре присутствуют три конкурентных реакционных центра, но менее активные при окислении: кратная связь и гидроксильные группы в 3-м и 28-м положении. У аллобетулина наблюдается наименьшая антиоксидантная активность, предположительно за счет наличия в структуре слабо активного центра взаимодействия с радикалами кислорода, а именно — ОН-группы в 3-м положении.

Выводы

Методом катодной вольтамперометрии проведено сравнение антиоксидантной активности ряда пентациклических терпеноидов: бетулина, диацетата бетулина и аллобетулина. Все исследуемые вещества снижали ток электровосстановления кислорода (ЭВ O_2), при этом потенциал сдвигался в положительную область, выявляя механизм ЕС (electrochemical-chemical) с дальнейшими химическими реакциями антиоксидантов с активными кислородными радикалами.

Показано, что в ряду исследуемых соединений наибольшую активность в отношении ингибирования процессов окисления проявляет диацетат бетулина, а наименьшую — аллобетулин. Несмотря на наличие в структуре бетулина трех конкурентных центров окисления, степень уменьшения тока ЭВ O_2 (как показателя антиоксидантной активности) была средней.

Предложены вероятные маршруты окисления диацетата бетулина и аллобетулина на поверхности индикаторного электрода при определении антиоксидантной активности методом вольтамперометрии.

К преимуществам данного метода можно отнести использование образцов в небольших количествах, экспрессность метода, простоту и дешевизну оборудования, отсутствие необходимости в дорогостоящих реактивах для проведения анализа.

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 // Хим.-фарм. журн. — 2007. — Т. 41, № 8. — С. 22–26.
- 2 Santos R.C. Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity / R.C. Santos, J.A.R. Salvador, S. Marin, M. Cascante // Bioorganic & Medicinal Chemistry. — 2009. — Vol. 17. — P. 6241–6250.
- 3 Tolstikova T.G. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives / T.G. Tolstikova, I.V. Sorokina, G.A. Tolstikov, A.G. Tolstikov, O.B. Flekhter // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. — 2006. — Vol. 32, No. 1. — P. 37–49.
- 4 Абышев А.З. Производные бетуленола как перспективные анти-ВИЧ агенты / А.З. Абышев, Р.А. Абышев, В.Х. Нгуен, В.А. Морозова // Медицинский академический журн. — 2013. — Т. 13, № 2. — С. 15–31.
- 5 Толстиков А.Г. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность / А.Г. Толстиков, О.Б. Флехтер, Э.Э. Шульц, Л.А. Балтина // Химия в интересах устойчивого развития. — 2005. — № 3. — С. 1–30.
- 6 Csuk R. Synthesis and biological evaluation of antitumor-active *c*-butyrolactone substituted betulin derivatives / R. Csuk, A. Barthel, S. Schwarz, H. Kommera, R. Paschke // Bioorganic & Medicinal Chemistry. — 2010. — Vol. 18. — P. 2549–2558.
- 7 Kazakova O.B. Synthesis, modification, and antimicrobial activity of the *N*-methylpiperazinyl amides of triterpenic acids / O.B. Kazakova, G.V. Giniyatullina, G.A. Tolstikov, N.I. Medvedeva, T.M. Utkina, O.L. Kartashova // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. — 2010. — Vol. 36, No. 3. — P. 383–389.
- 8 Карачурина Л.Т. Противовоспалительные и противовосенные свойства бисгемифталата бетулина / Л.Т. Карачурина, Т.А. Сапожникова, Ф.С. Зарудий, О.Б. Флехтер, Ф.З. Галин // Хим.-фарм. журн. — 2002. — № 8. — С. 32–33.
- 9 Kommera H. Small structural changes of pentacyclic lupine type triterpenoid derivatives lead to significant differences in their anticancer properties / H. Kommera, G.N. Kaluderovic, J. Kalbitz, B. Dräger, R. Paschke // European Journal of Medicinal Chemistry. — 2010. — Vol. 45. — P. 3346–3353.
- 10 Флехтер О.Б. Синтез и противовоспалительная активность новых ацилпроизводных бетулина / О.Б. Флехтер, Н.И. Медведева, Л.Т. Карачурина, Л.А. Балтина, Ф.С. Зарудий, Ф.З. Галин, Г.А. Толстиков // Хим.-фарм. журн. — 2002. — № 9. — С. 29–32.
- 11 Василенко Ю.К. Фармакологические свойства тритерпеноидов коры березы / Ю.К. Василенко, В.Ф. Семенченко, Л.М. Фролова // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 1993. — Т. 56, № 4. — С. 53–55.
- 12 Thibeault D. Synthesis and structure–activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3 β -*O*-monodesmosidic saponins starting from betulin / D. Thibeault, C. Gauthier, J. Legault, J. Bouchard, P. Dufour, A. Pichette // Bioorganic & Medicinal Chemistry. — 2007. — Vol. 15. — P. 6144–6157.
- 13 Lugemwa F.N. A Heliothis zea Antifeedant from the Abundant Birch bark Triterpene Betulin / F.N. Lugemwa, F.-Y. Huang, M.D. Bentley, M.J. Mendel, A.R. Alford // Journal of Agricultural and Food Chemistry. — 1990. — Vol. 38. — P. 493–496.
- 14 Пат. RU 2238554 / Пахомов В.П., Яшин Я.И., Яшин А.Я., Багирова В.Л., Арзамасцев А.П., Кулес В.Г., Ших Е.В., заявл. 25.07.2003; опубл. 20.10.2004, Бюл. № 29.
- 15 Кузнецова С.А. Получение диацетата бетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантной активности / С.А. Кузнецова, Н.Ю. Васильева, Г.С. Калачева, Н.М. Титова, Е.С. Редькина, Г.П. Скворцова // Журн. Сиб. фед. ун-та. Сер. Химия. — 2008. — Т. 1. — С. 151–165.
- 16 Кузнецова С.А. Выделение бетулина из бересты березы и изучение его физико-химических и фармакологических свойств / С.А. Кузнецова, Г.П. Скворцова, Ю.Н. Маляр, Е.С. Скурыдина, Е.Ф. Веселова // Химия растит. сырья. — 2013. — № 2. — С. 93–100.
- 17 Пат. RU 2402561 / Казакова О.Б., Медведева Н.И., Казаков Д.В., Толстиков Г.А., заявл. 13.05.2009; опубл. 27.10.2010, Бюл. № 30.
- 18 Avramchik O.A. Antioxidant and electrochemical properties of calcium and lithium ascorbates / Avramchik O.A., Korotkova E.I., Plotnikov E.V., Lukina A.N., Karbainov Y.A. // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. — 2005. — P. 1149–1154.
- 19 Дреффель К. Статистика в аналитической химии / К. Дреффель. — М.: Мир, 1994. — 268 с.

О.А. Воронова, Е.В. Плотников, С.С. Калиева, Е.Е. Нурпейс,
Е.А. Мамаева, А.К. Ташенов, А.А. Бакибаев

Вольтамперметрлік әдіспен лупан мен олеан қатарындағы тритерпеноидтар өкілдерінің тотығуға қарсы белсенділігін зерттеу

Табиғи қосылыстар мен олардың синтезделген туындыларының биологиялық белсенділігін анықтау зерттеушілердің ерекше назарында болуы себебінен, қарапайым және жылдам жүретін әдістерді табу өзекті мәселелердің бірі болып отыр. *In vivo* тәжірибелерін жасау жұмыстарының ауқымдылығы мен

маңыздылығының салдарынан, соңғы уақытта белгілі бір бейімделген түрдің биологиялық белсенділігін анықтауда физика-химиялық әдістердің қолдану аясы кеңейуде. Осындай әдістерге электрбелсенді бөлшектердің қатысында жүретін электрохимиялық процестердің қолдану аймағында кең таралған электрохимиялық әдістер жатады. Көптеген белгілі әдістерге қарамастан, пентациклді тритерпеноидтардың тотығуға қарсы белсенділігін анықтау нәтижелері мен әдістері туралы әдеби деректерде бірнеше ақпараттармен шектелген. Сондықтан, аталған қосылыс қатарының биологиялық белсенділігін зерттеу үшін электрохимиялық әдістердің қолдану мүмкіндігін кеңейту мақсатында біз вольтамперметрлік әдіспен пентациклді тритерпеноидтардың тотығуға қарсы белсенділігін анықтау жұмыстарын жасадық. Мақалада лупанды мен олеанды қатардағы мына қосылыстарға: бетулин, бетулиннің дицетаты, аллобетулиннің антиоксиданттық белсенділігінің көрсеткіштеріне салыстырмалы талдау жүргізілді. Яғни, бетулиннің дицетаты, аталған екі қосылысқа қарағанда, тотығуға қарсы белсенділігі айтарлықтай жоғары екендігі анықталды. Изопропенилдің көрінісіндегі қос байланыс оттектің радикалымен өзара әрекеттескенде белсенді орталық ретінде қатысатындығына болжам жасалды. Бетулиннің тотығуға қарсы белсенділігі орташа мәнді көрсетуінің себебі оның құрылысында бәсекелес және белсенді үш реакциялық орталықтың: 3- пен 28- жағдайындағы ОН-топтары мен еселенген байланыс тотығуға қатысады. Аллобетулин төменгі көрсеткіштегі тотығуға қарсы белсенділікті, яғни, 3-жағдайындағы әлсіз активті гидроксиль топтарымен көрсетеді.

Кілт сөздер: пентациклді тритерпеноидтар, бетулин, бетулиннің дицетаты, аллобетулин, тотығуға қарсы белсенділік, катодты вольтамперметрия.

O.A. Voronova, E.V. Plotnikov, S.S. Kaliyeva, Ye.E. Nurpeis,
E.A. Mamaeva, A.K. Tashenov, A.A. Bakibaev

Investigation of antioxidant activity representatives of triterpenoids series of lupane and oleane by using voltammetry

In connection with the focus of researchers to study the biological activity of natural compounds and their synthetic derivatives, development of simple and rapid methods for the solution of these problems becomes particularly relevant. As a result of significant cost and labor intensity of conducting *in vivo* experiments in recent years more widely used are physical and chemical methods of analysis, adapted to the measurement of a particular type of biological activity. Similar methods include electrochemical methods, field of application which extends to the electrochemical processes occurring with the participation of electroactive species. Despite the variety of known methods, literature data about the methods and results of measuring the antioxidant activity of pentacyclic triterpenoids are limited by several messages. In order to extend application possibilities of electrochemical methods for the study of biological activity a specified series of compounds, we carried out the determination of their antioxidant activity by using voltammetric method. In the work compared the performance of the antioxidant activity for these representatives of lupane and oleane series: betulin, betulin diacetate and allobetulin. It is shown that betulin diacetate has a more expressed antioxidant activity. It is suggested that the double bond in isopropenyl fragment appears as the most active center that interacts with oxygen radicals. Betulin shows average antioxidant activity, because of its structure is present three competitive and less active centers' by reaction of oxidation: multiple bonds and an OH — group at the 3- and 28-position. The lowest antioxidant activity shows allobetulin with less active hydroxyl group at the 3-position.

Keywords: pentacyclic triterpenoids, betulin, betulin diacetate, allobetulin, antioxidant activity, cathodic voltammetry.

References

- 1 Abyshev, A.Z., Agaev, E.M., & Guseinov, A.B. (2007). Issledovanie himicheskoho sostava ekstrakta kory berezy *Cortex Betula sem. Betulaceae* [Investigation of the chemical composition of birch bark extract *Cortex Betula, Betulaceae*]. *Himikofarmatsevticheskiy zhurnal — Chemical & Pharmaceutical Journal*, 41, 8, 22–26 [in Russian].
- 2 Santos, R.C., Salvador, J.A.R., Marin, S., & Cascante, M. (2009). Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 6241–6250.
- 3 Tolstikova, T.G., Sorokina, I.V., Tolstikov, G.A., Tolstikov, A.G., & Flekhter, O.B. (2006). Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 32, 1, 37–49.
- 4 Abyshev, A.Z., Abyshev, R.A., Nguen, V.H., & Morozova, V.A. (2005). Proizvodnye betulenola kak perspektivnye anti-VICH agenty [Betulenol derivatives as promising anti-HIV agents]. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal — Medical academic journal*, 13, 2, 15–31 [in Russian].
- 5 Tolstikov, A.G., Flekhter, O.B., Shults, E.E., & Baltina, L.A. (2005). Betulin i eho proizvodnye. Himiya i biologicheskaya aktivnost [Betulin and its derivatives. Chemistry and Biological Activity]. *Himiya v interesah ustoychivogo razvitiya. — Chemistry for Sustainable Development*, 3, 1–30 [in Russian].
- 6 Csuk R., Barthel A., Schwarz S., Kommerer H., & Paschke R. (2010). Synthesis and biological evaluation of antitumor-active *c*-butyrolactone substituted betulin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 2549–2558.

- 7 Kazakova O.B., Giniyatullina G.V., Tolstikov G.A., Medvedeva N.I., Utkina T.M., & Kartashova O.L. (2010). Synthesis, modification, and antimicrobial activity of the N-methylpiperazinyl amides of triterpenic acids. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 36, 3, 383–389.
- 8 Karachurina, L.T., Sapozhnikova, T.A., Zarudii, F.S., Flekhter, O.B., & Galin, F.Z. (2002). Protivovospalitel'nye i protivoiazvennye svoystva bishemifthalata betulina [Anti-inflammatory and antiulcer properties of bis-amyolphthalate betulin]. *Himiko-farmatsevticheskiy zhurnal — Chemical & Pharmaceutical Journal*, 8, 32–33 [in Russian].
- 9 Kommera H., Kaluderovic G.N., Kalbitz J., Dräger B., & Paschke R. (2010). Small structural changes of pentacyclic lupine tetraterpenoid derivatives lead to significant differences in their anticancer properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 3346–3353.
- 10 Flekhter, O.B., Medvedeva, N.I., Karachurina, L.T., Baltina, L.A., Zarudii, F.S., & Galin, F.Z., et al. (2002). Sintez i protivovospalitel'naya aktivnost novykh acilproizvodnykh betulina [Synthesis and anti-inflammatory activity of new acyl derivatives of betulin]. *Himiko-farmatsevticheskiy zhurnal — Chemical & Pharmaceutical Journal*, 9, 29–32 [in Russian].
- 11 Vasilenko, Yu.K., Semenchenko, V.F., & Frolova, L.M. (1993). Farmakologicheskie svoystva triterpenoidov kory berezy [Pharmacological properties of birch bark triterpenoids]. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya — Experimental and Clinical Pharmacology*, 56, 4, 53–55 [in Russian].
- 12 Thibeault, D., Gauthier, C., Legault, J., Bouchard, J., Dufour, P., & Pichette, A. (2007). Synthesis and structure–activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupane-type β -O-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 6144–6157.
- 13 Lagemwa, F.N., Huang, F.-Y., Bentley, M.D., Mendel, M.J., & Alford, A.R. (1990). A Heliothis zea Antifeedant from the Abundant Birch bark Triterpene Betulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 493–496.
- 14 Pat. RU 2238554 / Pahomov, V.P., Yashin, Ya.I., Yashin, A.Ya., Bagirova, V.L., Arzamastsev, A.P., Kukes, V.G., & Shikh, E.V., zayavl. 25.07.2003; opubl. 20.10.2004, Byul. № 29.
- 15 Kuznetsova, S.A., Vasileva, N.Yu., Kalacheva, G.S., Titova, N.M., Redkina, E.S., & Skvortsova, G.P. (2005). Poluchenie diacetata betulina iz beresty kory berezy i izuchenie ego antioksidantnoi aktivnosti [The preparation of betulin diacetate from the birch bark and the study of its antioxidant activity]. *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Seriya: Himiya — Journal of Siberian Federal University. Chemistry*, 1, 151–165 [in Russian].
- 16 Kuznetsova, S.A., Skvortsova, G.P., Malyar, Yu.N., Skurydina, E.S., & Veselova, E.F. (2013). Vydelenie betulina iz beresty berezy i izuchenie ego fiziko-himicheskikh i farmakologicheskikh svoystv [Isolation of betulin from the birch bark and the study of its physico-chemical and pharmacological properties]. *Himiya rastitel'nogo syrya — Chemistry of plant raw materials*, 2, 93–100 [in Russian].
- 17 Pat. RU 2402561 / Kazakova, O.B., Medvedeva, N.I., Kazakov, D.V., & Tolstikov, G.A., zayavl. 13.05.2009; opubl. 27.10.2010, Byul. № 30.
- 18 Avramchik O.A., Korotkova E.I., Plotnikov E.V., Lukina A.N., & Karbainov Y.A. (2005). Antioxidant and electrochemical properties of calcium and lithium ascorbates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1149–1154.
- 19 Dreffel, K. (1994). *Statistika v analiticheskoi himii [Statistics in Analytical Chemistry]*. Moscow: Mir [in Russian].