

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕТУЛИНА В КОРЕ ОСИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

О.А. Ёршик, О.В. Мушкина, А.Ю. Фисюк

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет» (Минск, Республика Беларусь)

Для цитирования: Ёршик О.А., Мушкина О.В., Фисюк А.Ю. Идентификация бетулина в коре осины обыкновенной методом жидкостной хроматографии. *Аспирантский вестник Поволжья*. 2024;25(3):XX-XX. DOI: <https://doi.org/10.35693/AVP680101>

■ Сведения об авторах

*Ёршик Ольга Александровна – канд. фарм. наук, доцент, доцент кафедры организации фармации с курсом повышения квалификации и переподготовки. ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-9977-7464> E-mail: Olga7081@mail.ru

Мушкина О.В. – канд. фарм. наук, доцент, заведующая кафедрой организации фармации с курсом повышения квалификации и переподготовки. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3397-1220> E-mail: olga7081@tut.by

Фисюк А.Ю. – преподаватель-стажер кафедры организации фармации с курсом повышения квалификации и переподготовки. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-6220-514X> E-mail: a.fisiuk@yandex.ru

*Автор для переписки

Получено: 21.05.2025

Одобрено: 26.06.2025

Опубликовано: 20.08.2025

■ Аннотация

Цель – проведение скрининга биологически активных веществ коры осины обыкновенной, обнаружение и идентификация бетулина в коре осины обыкновенной методом жидкостной хроматографии

Материал и методы. Объектом исследования являлись высушенные и измельченные образцы коры осины обыкновенной. Качественный анализ на кумарины, флавоноиды, сапонины, фенольные соединения проводили с помощью качественных химических реакций на указанные группы биологически активных веществ. Для хроматографирования использовали спиртовое извлечение и очищенную фракцию бетулина. Хроматографирование проводили на жидкостном хроматографе марки UltiMate 3000. Для разделения компонентов использовали колонку длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненную октадецилсилильным силикагелем для хроматографии с размером частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил–вода 90:10 (об/об) в изократическом режиме. Детектирование проводили при длине волны 206 нм.

Результаты. Методом качественного химического анализа в образцах коры осины обыкновенной обнаружены кумарины, флавоноиды, тритерпеновые сапонины и фенольные соединения. На всех хроматограммах обнаружены пики со временем удерживания около 7,5 минуты, обладающие подобными спектральными характеристиками. Это позволяет сделать вывод, что в спиртовом извлечении коры осины обыкновенной и в выделенной, очищенной фракции содержатся значительные количества бетулина. Содержание бетулина в спиртовом извлечении ($n=3$) составило $0,77 \pm 0,04\%$.

Выводы. 1. Методом качественного химического анализа в образцах коры осины обыкновенной обнаружены кумарины, флавоноиды, тритерпеновые сапонины фенольные соединения. 2. Методом жидкостной хроматографии в коре осины обыкновенной обнаружен и идентифицирован бетулин. 3. Бетулин рекомендован в качестве аналитического маркера при идентификации коры осины обыкновенной методом жидкостной хроматографии. 4. Показана перспективность применения жидкостной хроматографии для идентификации и оценки степени очистки бетулина при его выделении из коры осины обыкновенной.

■ **Ключевые слова:** осина обыкновенная, *Populus tremula* L., кора, скрининг, тритерпеновые сапонины, бетулин, жидкостная хроматография.

■ **Конфликт интересов:** не заявлен.

IDENTIFICATION OF BETULIN IN THE BARK OF ASPEN BY LIQUID CHROMATOGRAPHY

Volha A. Ershik, Volha V. Mushkina, Aleksandr Yu. Fisiuk

Belarusian State Medical University (Minsk, Republic of Belarus)

Citation: Ershik VA, Mushkina VV, Fisiuk AYU. Identification of betulin in the bark of aspen by liquid chromatography. *Aspirantskiy vestnik Povolzhia*. 2024;25(3):XX-XX. DOI: <https://doi.org/10.35693/AVP680101>

■ Information about the authors

*Volha A. Ershik – Cand. Sci. (Pharmacy), Associate professor, Associate professor of the Department of Pharmacy Organization with a course of advanced training and retraining. ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-9977-7464> E-mail: Olga7081@mail.ru

Volha V. Mushkina – Cand. Sci. (Pharmacy), Associate professor, Head of the Department of Pharmacy Organization with a course of advanced training and retraining. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3397-1220> E-mail: olga7081@tut.by

Aleksandr Yu. Fisiuk – trainee teacher of the Department of Pharmacy Organization with a course of advanced training and retraining. ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-6220-514X> E-mail: a.fisiuk@yandex.ru

*Corresponding author

Received: 21.05.2025

Accepted: 26.06.2025

Published: 20.08.2025

■ Abstract

Aim – screening of biologically active substances of common aspen bark, detection and identification of betulin in the bark of aspen by liquid chromatography.

Material and methods. The object of the study is dried and crushed samples of aspen bark. Qualitative analysis of coumarins, flavonoids, phenolic compounds and saponins was carried out using qualitative chemical reactions for the indicated groups of biologically active substances. Alcohol extraction and purified betulin fraction were used for chromatography. Chromatography was performed using an UltiMate 3000 liquid chromatograph. To separate the components, a column with a length of 250 mm and an inner diameter of 4.6 mm filled with octadecylsilyl silica gel for chromatography with a particle size of 5 microns was used. A mixture of acetonitrile-water 90:10 (v/v) in the isocratic mode was used as the mobile phase. Detection was performed at a wavelength of 206 nm.

Results. Using the method of qualitative chemical analysis, coumarins, flavonoids, phenolic compounds and triterpene saponins were found in samples of common aspen bark. Peaks with a retention time of about 7.5 minutes with similar spectral characteristics were found on all chromatograms. This allows us to conclude that the alcohol extraction of aspen bark and the isolated, purified fraction contain significant amounts of betulin. The betulin content in the alcohol extraction ($n=3$) was $0.77 \pm 0.04\%$.

Conclusion. 1. Using the method of qualitative chemical analysis, coumarins, flavonoids, triterpene saponins and phenolic compounds were found in samples of common aspen bark. 2. Betulin was detected and identified by liquid chromatography in the bark of aspen. 3. Betulin is recommended as an analytical marker in the identification of aspen bark by liquid chromatography. 4. The prospects of using liquid chromatography for the identification and assessment of the degree of purification of betulin during its isolation from the bark of aspen are shown.

■ **Keywords:** aspen, *Populus tremula* L., bark, screening, triterpene saponins, betulin, liquid chromatography.

■ **Conflict of interest:** *nothing to disclose.*

ВВЕДЕНИЕ

Осина обыкновенная (*Populus tremula* L.) является представителем семейства ивовых (Salicaceae) и широко произрастает на территории Республики Беларусь. В реестре лекарственных препаратов Республики Беларусь зарегистрированных растительных препаратов на основе лекарственного растительного сырья осины обыкновенной нет. В Единый реестр свидетельств о государственной регистрации единой нормативно-справочной информации Евразийского экономического союза включены биологически активные добавки к пище, содержащие кору осины. Все они производятся фармацевтическими предприятиями Российской Федерации¹.

Для расширения номенклатуры отечественных препаратов на основе лекарственного растительного сырья актуальна разработка лекарственных растительных препаратов и биологически активных добавок к пище на основе коры осины обыкновенной.

Для оценки качества растительных препаратов используют активные или аналитические маркеры, которые служат для расчета количества лекарственного растительного сырья или препаратов на основе лекарственного растительного сырья в готовом растительном препарате². Для лекарственного растительного сырья, в отношении которого информация о составляющих компонентах, ответственных за терапевтическую активность, отсутствует, необходимо проводить количественное определение активных или аналитических маркеров. Целесообразность выбора маркеров должна быть обоснована экспериментальными и научными данными³.

Ранее методом тонкослойной хроматографии нами был проведен скрининг основных групп биологически активных веществ, входящих в состав коры осины,

и обнаружена мажоритарная группа биологически активных веществ – тритерпеновые сапонины. В ходе скрининга мы обнаружили вещество, которое относится к группе пентациклических тритерпеновых сапонинов производных лупана, – бетулин.

Рекомендована стандартизация коры осины обыкновенной по сумме тритерпеновых сапонинов, а также обнаружение и идентификация бетулина как аналитического маркера мажоритарной группы биологически активных веществ коры осины обыкновенной методом тонкослойной хроматографии.

Бетулин, а также его производные, выделенные из растительных объектов, обладают доказанными антиоксидантными [1–3], гастропротекторными, противовоспалительными, капилляроукрепляющими [4], противовирусными и противоопухолевыми [5], противовоспалительными свойствами [6]. Поэтому бетулин может выступать в роли активного маркера (компонента, который вносит вклад в терапевтическую активность) и использоваться при стандартизации растительных препаратов на основе коры осины.

ЦЕЛЬ

Проведение скрининга биологически активных веществ коры осины обыкновенной, обнаружение и идентификация бетулина в коре осины обыкновенной методом жидкостной хроматографии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являются образцы коры осины обыкновенной, заготовленные в 2024 году на территории Республики Беларусь, высушенные методом воздушно-тепловой сушки и измельченные на универсальной мельнице VLM-6 до грубого порошка с частицами размером 1400 мкм

¹ Единый реестр свидетельств о государственной регистрации. Доступно по: <https://nsi.eaeunion.org/portal/1995?searchText=&date=2024-11-30>

² Руководство по оценке качества лекарственных препаратов на основе комбинаций лекарственного растительного сырья и (или) растительных фармацевтических субстанций (препаратов на основе лекарственного растительного сырья). Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии. 2021;8.

³ Руководство по выбору тестов и критериев приемлемости для составления спецификаций на лекарственное растительное сырье, растительные фармацевтические субстанции (препараты на основе лекарственного растительного сырья) и лекарственные растительные препараты. Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии. 2019;6.

(не менее 96% порошка проходит через сито с размером отверстий 1400 мкм)¹.

Скрининг биологически активных веществ

Качественный анализ на кумарины, флавоноиды и сапонины проводили с помощью качественных химических реакций на указанные группы биологически активных веществ.

Для качественного обнаружения кумаринов получали спиртовое (95% этанол) извлечение коры осины обыкновенной в соотношении сырье:экстракт 1:10 в условиях нагревания с обратным холодильником на водяной бане в течение 15–20 минут.

Качественный анализ на флавоноиды проводили со спиртовым (70% этанол) извлечением коры осины обыкновенной в соотношении сырье:экстракт 1:15 в условиях нагревания с обратным холодильником на водяной бане в течение 15–20 минут.

Обнаружение сапонинов с помощью качественных реакций проводили с водным извлечением и извлечением, полученным на изотоническом растворе хлорида натрия, коры

осины обыкновенной в соотношении сырье:экстракт 1:20 в условиях нагревания с обратным холодильником на водяной бане в течение 10 минут.

Для качественного химического анализа обнаружения фенольных соединений получали водное извлечение коры осины обыкновенной в соотношении сырье:экстракт 1:50 в условиях нагревания с обратным холодильником на водяной бане в течение 10 минут.

Методика обнаружения, идентификации и количественного определения бетулина методом жидкостной хроматографии

В работе использовали валидированную методику [7, 8]. Хроматографирование проводили на жидкостном хроматографе марки UltiMate 3000, оснащенном диодно-матричным детектором. Для разделения компонентов использовали колонку ACE Equivalence C18 длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненную октадецилсилильным силикагелем для хроматографии с размером частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил-вода 90:10 (об/об)

Таблица 1 / Table 1

Результаты качественного химического анализа биологически активных веществ коры осины обыкновенной Results of qualitative chemical analysis of biologically active substances of common aspen bark

Методика качественной реакции	Ожидаемый результат	Наблюдаемый аналитический эффект
Кумарины		
Лактонная проба В две пробирки наливают по 2 мл спиртового извлечения и прибавляют по 0,5 мл 10% спиртового раствора гидроксида натрия. Одну пробирку нагревают на спиртовке до кипения и охлаждают, другую оставляют без нагревания. В каждую пробирку приливают по 4 мл воды очищенной. Раствор, полученный при нагревании с 10% гидроксидом натрия, разливают на 2 части. Первую половину раствора подкисляют несколькими каплями хлороводородной кислоты (концентрированной).	В случае присутствия в исследуемой пробе кумаринов нагревание с 10% спиртовым раствором гидроксида натрия приводит к появлению желтого окрашивания (растворимые соли кумаровой кислоты). После подкисления испытуемого раствора несколькими каплями хлороводородной кислоты (концентрированной) происходит выпадение осадка (нерастворимые кумарины).	При нагревании испытуемого раствора с 10% спиртовым раствором гидроксида натрия наблюдали появление желтого окрашивания. При подкислении несколькими каплями хлороводородной кислоты (концентрированной) наблюдали выпадение осадка.
Диазореакция Ко второй половине раствора, полученного при нагревании с 10% раствором гидроксида натрия, приливают 2-3 капли свежеприготовленного раствора диазотированной сульфаниловой кислоты (дiazoreактив).	В случае присутствия в исследуемой пробе кумаринов (раскрытого лактонного кольца) появляется вишнево-бурое окрашивание раствора.	Вишнево-бурое окрашивание раствора.
Флавоноиды		
Цианидиновая проба по Шиноду К 1 мл спиртового извлечения прибавляют 3-4 капли хлороводородной кислоты (концентрированной) и 10–15 г (2 гранулы) металлического цинка, после чего нагревают на кипящей водяной бане.	В случае присутствия в исследуемой пробе флавоноидов раствор приобретает розовое окрашивание.	Розовое окрашивание испытуемого раствора.
Цианидиновая проба по Брианту К испытуемому раствору цианидиновой пробы по Шиноду прибавляют н-бутанол и воду до разделения фаз, встряхивают.	В случае присутствия в исследуемой пробе флавоноидов в форме агликонов окрашивание переходит в органическую фазу. В случае присутствия в исследуемой пробе флавоноидов в форме гликозидов окрашивание сохраняется в водной фазе. В случае присутствия в исследуемой пробе флавоноидов в двух формах (агликоны и гликозиды) наблюдают окрашивание обеих фаз.	Розовое окрашивание органической фазы.

¹ Государственная фармакопея Республики Беларусь. Общие методы контроля качества лекарственных средств. 2012.

Реакция с раствором щелочи К 1 мл спиртового извлечения добавляют 2-3 капли 5% спиртового раствора гидроксида натрия.	В случае присутствия в исследуемой пробе флавоноидов раствор приобретает окрашивание от желтого до коричневого.	Красно-оранжевое окрашивание раствора.
Реакция комплексообразования с раствором хлорида алюминия К 1 мл спиртового извлечения добавляют 2-3 капли 2% спиртового раствора хлорида алюминия.	В случае присутствия в исследуемой пробе флавоноидов раствор приобретает желтое окрашивание, флуоресцирующее зеленовато-желтым цветом на границе «раствор – воздух» в ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм.	Желтое окрашивание раствора. Зеленовато-желтая флуоресценция в ультрафиолетовом свете (365 нм) на границе «раствор – воздух» при взбалтывании.
Реакция осаждения раствором основного ацетата свинца К 1 мл спиртового извлечения добавляют 3–5 капель раствора основного ацетата свинца.	В случае присутствия в исследуемой пробе флавоноидов наблюдают выпадение желтого осадка.	Желтый осадок.
Сапонины		
Гемолиз эритроцитов К 1 мл извлечения на изотоническом растворе хлорида натрия добавляют 1 мл 2% взвеси эритроцитов в изотоническом растворе хлорида натрия.	В случае присутствия в исследуемой пробе сапонинов наблюдают образование лаковой крови (прозрачное ярко-красное окрашивание).	Лаковая кровь (прозрачное ярко-красное окрашивание).
Реакция пенообразования В 2 пробирки одинакового диаметра и высоты вносят по 0,5 мл водного извлечения. В одну пробирку добавляют 1 мл 0,1н раствора хлороводородной кислоты, в другую – 1 мл 0,1н раствора гидроксида натрия. Затем пробирки одновременно сильно встряхивают.	В случае присутствия в исследуемой пробе тритерпеновых сапонинов наблюдают в обеих пробирках столбики пены, равные по стойкости и объему. В случае присутствия в исследуемой пробе стероидных сапонинов наблюдают в обеих пробирках столбики пены, не равные по стойкости и объему. В пробирке с 1 мл 0,1н раствора гидроксида натрия столбик пены больше по сравнению с пробиркой с 1 мл 0,1н раствора хлороводородной кислоты.	В обеих пробирках столбики пены, равные по стойкости и объему.
Реакция осаждения раствором среднего ацетата свинца К 1 мл водного извлечения добавляют 3 капли раствора среднего ацетата свинца.	В случае присутствия в исследуемой пробе тритерпеновых сапонинов наблюдают выпадение желтого осадка.	Желтый осадок.
Реакция осаждения раствором основного ацетата свинца К 1 мл водного извлечения добавляют 3 капли раствора основного ацетата свинца.	В случае присутствия в исследуемой пробе стероидных сапонинов наблюдают выпадение желтого осадка.	Выпадение желтого осадка отсутствует.
Фенольные соединения		
Реакция с фосфорномолибденово-вольфрамовым реактивом К 2 мл водного извлечения добавляют 1 мл раствора фосфорномолибденово-вольфрамового реактива в среде раствора 290 г/л натрия карбоната.	В случае присутствия в исследуемой пробе фенольных соединений наблюдают синее окрашивание.	Синее окрашивание раствора.
Реакция с 4-(N,N-диметиламинокоричным альдегидом К 0,1 мл водного извлечения добавляют 0,5 мл спиртового раствора 20 г/л 4-(N,N-диметиламинокоричного альдегида, предварительно смешанного 1:1 со спиртовым раствором 6N серной кислоты.	В случае присутствия в исследуемой пробе конденсированных дубильных веществ (проантоцианидинов) наблюдают зеленое окрашивание.	Зеленое окрашивание раствора.
Реакция с железоаммонийными квасцами К 2 мл водного извлечения добавляют 4 капли 1% раствора железоаммонийных квасцов.	В случае присутствия в исследуемой пробе конденсированных дубильных веществ (проантоцианидинов) наблюдают зеленое окрашивание. В случае присутствия в исследуемой пробе гидролизующих дубильных веществ наблюдают синее окрашивание.	Зеленое окрашивание раствора.
Реакция с раствором ванилина К 2 мл водного извлечения добавляют 2 мл 1 г/л раствора ванилина и 1 мл 10 г/л раствора серной кислоты.	В случае присутствия в исследуемой пробе мономерных единиц дубильных веществ (катехинов) наблюдают красное окрашивание.	Красное окрашивание раствора.

в изократическом режиме. Скорость подвижной фазы составила 1,0 мл/мин, температура колонки – 40°C. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Детектирование проводили при длине волны 206 нм. Время анализа составляло около 20 минут.

В работе использовали ацетонитрил (HPLC, Thermo Fisher scientific, кат. № P300000GMPDM55M), спирт этиловый 96%, стандартный образец бетулина (Glentham Life Sciences, кат. № GP5633).

Спиртовое извлечение коры осины обыкновенной получали путем нагревания до кипения лекарственного растительного сырья с 70% спиртом этиловым в колбе с обратным холодильником в течение 30 минут в соотношении 1:10 (м/об). Время отсчета экстракции отсчитывали от момента закипания экстрагента.

Извлечение и очистку фракции бетулина проводили в соответствии с методикой, описанной в работе [4, 9–12]. Для этого проводили экстракцию коры осины спиртом бутиловым с последующей очисткой щелочным гидролизом при нагревании в течение 3 часов.

Раствор сравнения готовили путем растворения около 0,010 г стандартного образца в спирте этиловом 96%.

Содержание бетулина (X , %) в коре осины рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S}{S_0} \times \frac{V_s}{m} \times \frac{g_0 \times P}{V_0 \times 100} \times 100$$

где: S – площадь основного хроматографического пика на хроматограмме испытуемого раствора (спиртовое извлечение); S_0 – площадь хроматографического пика бетулина на хроматограмме раствора сравнения; V_s – объем экстрагента, мл; m – масса сырья, использованного для приготовления спиртового извлечения, г; g_0 – масса навески стандартного образца, г; P – чистота стандартного образца, %; V_0 – объем колбы, мл.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета анализа данных программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты качественного химического анализа образцов коры осины обыкновенной на наличие кумаринов, флавоноидов и сапонинов приведены в **таблице 1**.

Методом качественного химического анализа в образцах коры осины обыкновенной обнаружены кумарины, флавоноиды, тритерпеновые сапонины и фенольные соединения.

Типичные хроматограммы и спектры раствора стандартного образца бетулина, спиртового извлечения коры осины обыкновенной, выделенной и очищенной фракции бетулина приведены на **рисунках 1–3**.

На всех хроматограммах обнаружены пики со временем удерживания около 7,5 минуты, обладающие подобными спектральными характеристиками. Это позволяет сделать вывод, что в спиртовом извлечении коры осины обыкновенной и в выделенной, очищенной фракции содержится значительные количества бетулина.

Содержание бетулина в спиртовом извлечении ($n=3$) составило $0,77 \pm 0,04\%$.

Таким образом, экспериментально обоснована целесообразность выбора бетулина в качестве аналитического маркера для расчета количества лекарственного растительного сырья.

Другие соизвлекаемые биологически активные вещества не затрудняют обнаружение аналитического маркера, что не будет обуславливать определенные трудности при проведении оценки подлинности (идентификации) и качества лекарственного растительного сырья, а также лекарственных растительных препаратов из коры осины обыкновенной.

Подлинность коры осины обыкновенной в виде испытаний на идентификацию (подлинность) бетулина специфична для данного вида лекарственного растительного сырья. Приемлемым считается использование хроматографических методик испытаний на идентификацию (подлинность) бетулина в комбинации методами жидкостной и тонкослойной хроматографии.

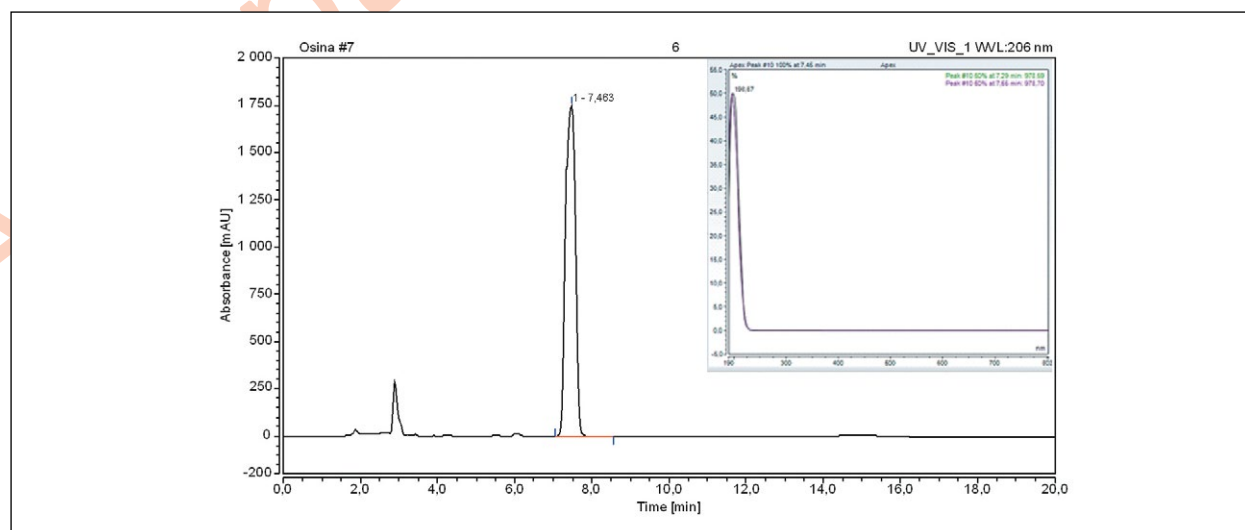


Рисунок 1. Хроматограмма раствора стандартного образца бетулина.

Figure 1. Chromatogram of a solution of a standard sample of betulin.

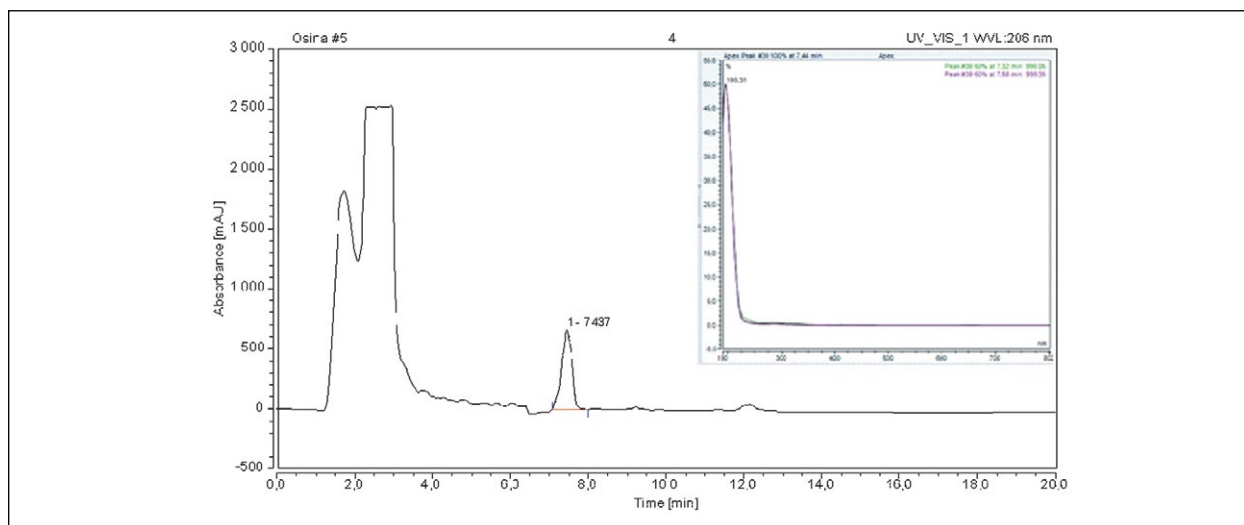


Рисунок 2. Хроматограмма спиртового извлечения из коры осины обыкновенной.

Figure 2. Chromatogram of alcohol extraction from the bark of aspen.

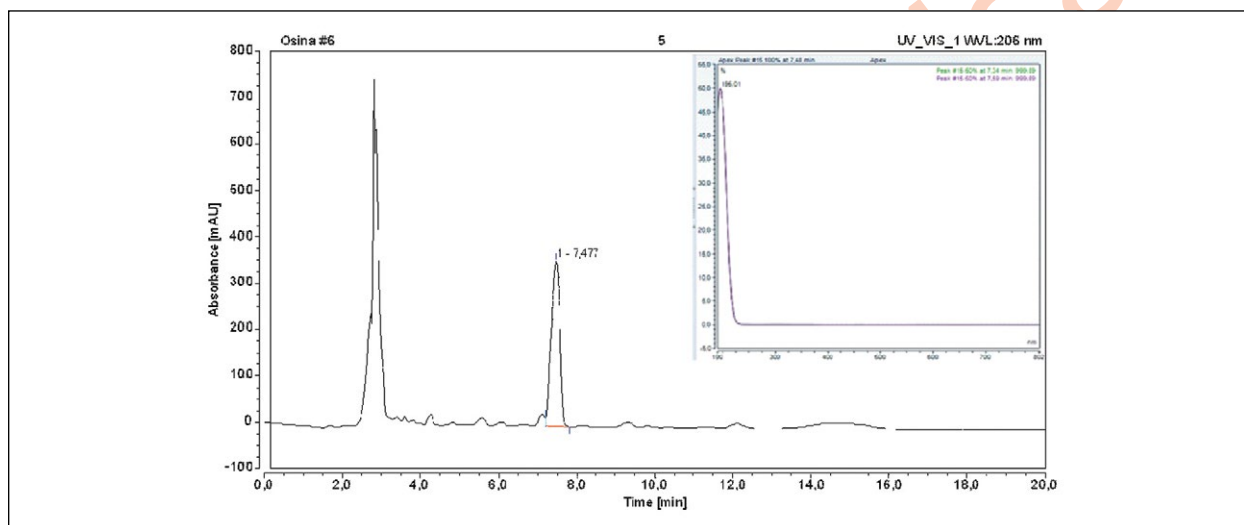


Рисунок 3. Хроматограмма очищенной фракции бетулина из коры осины обыкновенной.

Figure 3. Chromatogram of the purified betulin fraction from the bark of aspen.

Для расчета количества лекарственного растительного сырья или препаратов на основе лекарственного растительного сырья в готовом растительном препарате требуется разработка и валидация методики количественного определения бетулина в коре осины обыкновенной с учетом многофакторного параметрического моделирования процесса экстракции бетулина из коры осины обыкновенной.

ВЫВОДЫ

1. Методом качественного химического анализа в коре осины обыкновенной обнаружены кумарины, флавоноиды, тритерпеновые сапонины и фенольные соединения.

2. Методом жидкостной хроматографии в коре осины обыкновенной обнаружен и идентифицирован бетулин.

3. Бетулин рекомендован в качестве аналитического маркера при идентификации коры осины обыкновенной методом жидкостной хроматографии.

4. Показана перспективность применения жидкостной хроматографии для идентификации и оценки степени очистки бетулина при его выделении из коры осины обыкновенной.

Литература / References

1. Skurydina ES, Vasil'yeva NYu, Kuznetsova SA, et al. Development of the one-step method for producing allobetulin from birch bark and study of its antioxidant activity. *Chemistry of plant raw material*. 2023;3:243-252. [Скурыдина Е.С., Васильева Н.Ю., Кузнецова С.А., и др. Разработка одностадийного способа получения аллобетулина из бересты коры березы и изучение его антиоксидантной активности. *Химия растительного сырья*. 2023;3:243-252]. DOI: [10.14258/jcpm.20230313179](https://doi.org/10.14258/jcpm.20230313179)
2. Frolova KA. Betulin as an antioxdant. *Forcipe*. 2023;6(2):218. (In Russ.). [Фролкова К.А. Бетулин как антиоксидант. *Forcipe*. 2023;6(2):218].

3. Averyanova EV, Shkolnikova MN, Chugunova OV. Antioxidant Properties of Triterpenoids in Fat-Containing Products. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2022;52(2):233-243. [Аверьянова Е.В., Школьникова М.Н., Чугунова О.В. Исследование антиоксидантных свойств тритерпеноидов в составе жиросодержащих продуктов. Техника и технология пищевых производств. 2022;52(2):233-243]. DOI: [10.21603/2074-9414-2022-2-2358](https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-2-2358)
4. Kuznetsova SA, Skvortsova GP, Maliar YuN, et al. Extraction betulin from birch bark and study of its physicochemical and pharmacological properties. *Chemistry of plant raw material*. 2013;2:93-100. [Кузнецова С.А., Скворцова Г.П., Малиар Ю.Н., и др. Выделение бетулина из бересты березы и изучение его физико-химических и фармакологических свойств. Химия растительного сырья. 2013;2:93-100]. DOI: [10.14258/jcprm.1302093](https://doi.org/10.14258/jcprm.1302093)
5. Amiri S, Dastghaib S, Ahmadi M, et al. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects. *Biotechnology Advanced*. 2020;38:107409. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2019.06.008](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.008)
6. Sergeev DV. Clinical and experimental evaluation of anti-inflammatory properties of betulin (In Russ.). [Сергеев Д.В. Клинико-экспериментальная оценка противовоспалительных свойств бетулина]. URL: <https://medical-diss.com/medicina/kliniko-eksperimentalnaya-otsenka-protivovospalitelnyh-svoystv-betulina> (02 May 2025)
7. Vorob'eva OA, Mel'nikova NB. Development and validation of methods for analyzing the components of the pharmaceutical composition betulin and thymol in pumpkin seed Cucurbita pepo oil. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2015;10(2):295-303. [Воробьева О.А., Мельникова Н.Б. Разработка и валидация методов анализа компонентов фармацевтической композиции бетулина и тимола в масле семян тыквы Cucurbita pepo. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015;10(2):295-303]. URL: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=7487>
8. Lebedeva RA, Malygina DS. Identification and quantitative determination of betulin diacetate as a potential pharmaceutical substance. *Fundamental and applied research: problems and results*. 2016;24:155-160. [Лебедева Р.А., Малыгина Д.С. Идентификация и количественное определение диацетата бетулина как потенциальной фармацевтической субстанции. Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты. 2016;24:155-160]. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/identifikatsiya-i-kolichestvennoe-opredelenie-diatsetata-betulina-kak-potentsialnoy-farmatsevticheskoy-substantsii> (26.05.2025)
9. Levdansky VA, Levdansky AV. Extraction of betulin by aliphatic alcohols c3-c4 from an external layer of a birch bark hydrolyzed in aqueous alkaline solution. *Chemistry of plant raw material*. 2014;1:131-137. [Левданский В.А., Левданский А.В. Экстракция бетулина алифатическими спиртами C3-C4 из бересты березы, гидролизованной в водном растворе щелочи. Химия растительного сырья. 2014;1:131-137]. DOI: [10.14258/jcprm.1401131](https://doi.org/10.14258/jcprm.1401131)
10. Kasenov RZ, Demets OV, Kartbaeva GT, et al. Study of the quantitative yield of betulin from the Kyrgyz birch and synthesis of its phosphorylated derivative. *Bulletin of Karaganda University*. 2019;3(95). [Касенов Р.З., Демец О.В., Картбаева Г.Т., и др. Исследование количественного выхода бетулина из березы киргизской и синтез его фосфорилированного производного. Вестник Карагандинского университета. 2019;3(95)]. DOI: [10.31489/2019bmg3/13-19](https://doi.org/10.31489/2019bmg3/13-19)
11. Ayvazyan AA, Bozova AP, Nagaeva KA, et al. Influence of production methods and particle sizes of raw materials on the yield and purity of betulin. In: *Waste processing technologies to obtain new products*. 2022:141-143. (In Russ.). [Айвазян А.А., Бозова А.П., Нагаева К.А., и др. Влияние способов получения и размеров частиц сырья на выход и чистоту бетулина. В сб.: Технологии переработки отходов с получением новой продукции. 2022:141-143].
12. Demets OV, Takibayeva AT, Kassenov RZ, et. al. Methods of Betulin Extraction from Birch Bark. *Molecules*. 2022;27(11):3621. DOI: [10.3390/molecules27113621](https://doi.org/10.3390/molecules27113621)

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ	ADDITIONAL INFORMATION
Источник финансирования. Работа выполнена по инициативе авторов без привлечения финансирования.	Study funding. The work was carried out on the initiative of the authors without attracting funding.
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с содержанием настоящей статьи.	Conflict of interests. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the content of this article.
Участие авторов. Мушкина О.В. – разработка концепции исследования, редактирование текста. Ёршик О.А., Фисюк А.Ю. – сбор данных и непосредственное проведение исследований, написание текста. Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.	Contribution of individual authors. Mushkina V.V.: development of the research concept, text editing. Ershik V.A., Fisyuk A.Yu.: data collection and direct research, writing the text. All authors gave their final approval of the manuscript for submission, and agreed to be accountable for all aspects of the work, implying proper study and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.