

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук»

На правах рукописи

Никонова Наталья Николаевна



ВЫДЕЛЕНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДРЕВЕСНОЙ
ЗЕЛЕНИ СОСНЫ И ЛИСТВЕННИЦЫ МЕТОДОМ ЭМУЛЬСИОННОЙ
ЭКСТРАКЦИИ

05.21.03 – Технология и оборудование химической переработки биомассы дерева;
химия древесины

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель:
академик РАН, профессор, д.х.н. Кучин А.В.

Сыктывкар 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	10
1.1 Химический состав лиственницы сибирской	10
1.2 Химический состав сосны обыкновенной	18
1.3 Биологическая активность компонентов ДЗ сосны и лиственницы.....	24
1.4 Методы переработки древесного сырья.....	27
ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	38
2.1 Приборы и реактивы	38
2.2 Подготовка сырья к экстракции	39
2.3 Эмульсионный способ выделения экстрактивных веществ	39
2.4 Фракционирование нейтральных компонентов эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы.....	42
2.5 Фракционирование кислых компонентов эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы.....	45
2.6 Исследование биологической активности эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы.....	47
ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	51
3.1 Выделение экстрактивных веществ из ДЗ сосны в лабораторном экстракторе	51
3.2 Выделение экстрактивных веществ из ДЗ лиственницы в лабораторном экстракторе.....	57
3.3 Анализ фракционного состава нейтральных компонентов эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы	58
3.4 Анализ фракционного состава кислых компонентов эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы	61
3.5 Эмульсионная экстракция низкомолекулярных соединений из растительного сырья в аппаратах роторно-пульсационного и гравитационного типа	65
3.6 Исследование биологической активности эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы.....	72
3.7 Предлагаемый вариант переработки ДЗ сосны и лиственницы	79

ВЫВОДЫ	81
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	82
ПРИЛОЖЕНИЕ А	104
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	105
ПРИЛОЖЕНИЕ В	106
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	107
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	108

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ДЗ	древесная зелень
БАВ	биологически активные вещества
ЭМ	эфирные масла
ЭВ	Экстрактивные вещества
ГМ	Гидромодуль
ТСХ	тонкослойная хроматография
д.э.	диэтиловый эфир
п.э.	петролейный эфир
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ИК	инфракрасный
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
ГЖ	газожидкостная
ГЖХ	газожидкостная хроматография
м.д.	миллионные доли
Н.К.	нейтральные компоненты
К.К.	кислые компоненты

ВВЕДЕНИЕ

Рациональное природопользование относится к стратегии научно-технологического развития Российской Федерации, которая предусматривает переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, разработку и внедрение систем рационального применения средств химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений и животных, хранение и эффективную переработку сельскохозяйственной продукции, создание безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания.

Обеспечение рационального природопользования и переход к современным ресурсосберегающим технологиям связан с поиском высокоэффективных способов переработки возобновляемого растительного сырья, комплексному использованию лесных ресурсов. Лесной кодекс, принятый в 2006 году, предполагает использование не только древесины, но и недревесных лесных ресурсов для получения высококачественной продукции. В лесопромышленном комплексе древесная биомасса используется весьма нерационально. На 1 м³ вывезенной из леса древесины приходится до 500 кг отходов биомассы в виде пней, ветвей, древесной зелени.

Объектами исследования является древесная зелень (ДЗ) (охвоенные ветки) сосны обыкновенной и лиственницы сибирской. Разнообразие биологически активных компонентов древесной зелени хвойных пород определяет широкие возможности ее применения. Разработаны различные способы переработки древесной зелени для извлечения высоко- и низкомолекулярных экстрактивных веществ (ЭВ). Низкомолекулярные соединения - одна из самых многочисленных и распространенных групп природных соединений. Это терпеноиды, жирные, смоляные, фенолкарбоновые и тритерпеновые кислоты, флавоноиды, стильбены, лигнаны. Совершенствование технологий комплексной переработки хвойной древесной зелени позволит наиболее полно извлекать ценнейшие природные

вещества и получать биологически активные препараты для фармакологии, ветеринарии, сельского хозяйства.

Традиционные способы выделения низкомолекулярных соединений характеризуются избирательностью, длительностью и использованием пожароопасных и токсичных органических растворителей (бензин, этанол, ацетон, этилацетат). Разработанный в Институте химии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН экологически безопасный эмульсионный способ экстракции растительного сырья в водно-щелочной среде по эффективности не уступает традиционным методам извлечения низкомолекулярных компонентов и позволяет эффективно выделять гидрофильные и гидрофобные соединения без применения органических растворителей. Таким образом, выделение низкомолекулярных соединений из хвойной древесной зелени является актуальной задачей.

Диссертация соответствует специальности 05.21.03 – Технология и оборудование химической переработки биомассы дерева; химия древесины. Область исследований: п. 12. Химия и технология лесохимических продуктов и биологически активных веществ; п. 13. Химия и технология переработки древесной зелени, однолетних растений, водорослей и т. д.

Цель исследования

Выделение экстрактивных веществ из ДЗ сосны обыкновенной и лиственницы сибирской методом эмульсионной экстракции, изучение компонентного состава и биологической активности.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- определить влияние концентрации водно-щелочного раствора и гидромодуля на эффективность эмульсионной экстракции ДЗ сосны обыкновенной и лиственницы сибирской в лабораторных условиях;
- исследовать химический состав экстрактивных веществ, выделенных эмульсионным методом из исследуемого сырья;
- определить оптимальные параметры выделения экстрактивных веществ в гравитационном и роторно-пульсационном аппаратах;

- исследовать биологическую активность эмульсионных экстрактов и предложить возможные направления их практического применения.

Научная новизна

Впервые выделены экстрактивные вещества из ДЗ сосны и лиственницы экологически безопасным эмульсионным методом.

Впервые исследован состав эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы. Установлено, что мажорными компонентами эмульсионного экстракта ДЗ сосны являются пинифоловая кислота, метиловый эфир пинифоловой кислоты и изоабиенол, ДЗ лиственницы – *n*-кумаровая кислота.

Впервые для эмульсионной экстракции растительного сырья использован аппарат гравитационного типа. Установлена высокая эффективность эмульсионного метода выделения экстрактивных веществ из ДЗ сосны и лиственницы.

Теоретическая и практическая значимость

Установлены условия эффективного выделения низкомолекулярных соединений ДЗ сосны и лиственницы экологически безопасным эмульсионным методом.

Получены и охарактеризованы эмульсионные экстракты ДЗ сосны и лиственницы, обладающие антиоксидантной активностью.

Получены новые данные об индивидуальном составе нейтральной и кислотной фракций эмульсионных экстрактов исследуемого сырья. Благодаря высокой концентрации дитерпеноидов, ароматических соединений, и полипренолов экстракты могут использоваться как готовый продукт, или перерабатываться с получением индивидуальных компонентов. Данные продукты могут найти применение в качестве лекарственного средства в фармакологии, растениеводстве и животноводстве.

Положения, выносимые на защиту

1. Влияние условий эмульсионной экстракции ДЗ сосны обыкновенной и лиственницы сибирской на степень извлечения экстрактивных веществ в

лабораторном экстракторе и аппаратах роторно-пульсационного и гравитационного типа.

2. Результаты комплексных исследований индивидуального и группового химического состава эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы.

3. Оценка биологической активности эмульсионных экстрактов и отдельных фракций кислых и нейтральных компонентов ДЗ сосны и лиственницы.

Достоверность и обоснованность результатов обеспечены проведением параллельных экспериментов и их воспроизводимостью, применением методов статистической обработки результатов исследований при определении влияния технологических параметров на степень извлечения ЭВ. Идентификацию и строение соединений осуществляли с использованием современного аналитического оборудования, сравнением полученных результатов с литературными данными, а также сравнением с эталонными образцами соединений.

Публикации и апробация работы

Результаты исследования были доложены и обсуждены на X, XI Всероссийской научной конференции с международным участием «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар, 2018, 2019); международной конференции, посвящённой 90-летию со дня рождения академика Б.А. Пурина «Экстракция и мембранные методы в разделении веществ» (Москва, 2018); XI, XII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием «Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности» (Бийск, 2018, 2019); VI Международной молодежной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современного материаловедения» (Уфа, 2019); XIII международного биотехнологического форума-выставки «Росбиотех-2019» (Москва, 2019); XXXII зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2020); XXIII Всероссийской конференции молодых учёных-химиков (с международным участием) (Нижний Новгород, 2020); II Всероссийской научно-практической

конференции «Утилизация отходов производства и потребления: инновационные подходы и технологии» (Киров, 2020); XXIII Международной конференции «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии» (Екатеринбург, 2020); II Всероссийской молодежной научно-практической конференции, посвященной 70-летию Уфимского Института химии УФИЦ РАН и 70-летию Уфимского федерального исследовательского центра РАН «Вершины науки – покорять молодым! Современные достижения химии в работах молодых ученых» (Уфа, 2021).

По материалам диссертации опубликовано 5 статей, из них 2 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК и 18 тезисов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта «Аспиранты» № 19-38-90283 («Технология выделения низкомолекулярных компонентов древесной зелени сосны и лиственницы методом эмульсионной экстракции», 2019 г.).

Все физико-химические, спектральные и аналитические исследования соединений, выделенных в данной работе, были выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Химия» Института химии Коми НЦ УрО РАН. Автор благодарит Е. Н. Зайнулину и Е. У. Ипатову за исследования выделенных соединений методами ЯМР и ИК спектроскопии. Особую признательность хочу выразить своему научному руководителю д.х.н. А. В. Кучину, старшему научному сотруднику к.х.н. Т. В. Хуршкайнен – за идеи научных исследований и непосредственную помощь в работе, а также всем сотрудникам Лаборатории органического синтеза и химии природных соединений.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В настоящее время все большее внимание исследователей привлекают проблемы использования древесной зелени. Это объясняется в первую очередь тем, что компоненты, входящие в ее состав, относятся к соединениям, имеющим широкий спектр биологической активности.

Разнообразие органических соединений ДЗ обусловлено тем, что основная масса процессов метаболизма, обеспечивающих рост и нормальную жизнедеятельность растения, протекает именно в клетках органов, входящих в ее состав. Учитывая, что ДЗ хвойных пород - это единственное растительное сырье, которое в свежем виде можно перерабатывать в течение всего года, появляются широкие возможности для исследования, а в дальнейшем и использования соединений, содержащихся в ней.

Для разработки и совершенствования технологии переработки ДЗ необходимо знать химический состав и содержание биологически активных соединений в хвое, коре и древесных побегах. Химический состав ДЗ чрезвычайно сложен и разнообразен. Он зависит от многих условий: видовых и индивидуальных особенностей растений, возраста растительного организма, условий окружающей среды, типа почвы, а также от соотношения хвои и побегов.

Особенности классификации химического состава растительного сырья в каждом конкретном случае определяются ее целевым назначением.

1.1 Химический состав лиственницы сибирской

Род *Larix* на территории Российской Федерации среди древесных растений является одним из главных и наиболее распространенных лесообразующих пород. Лиственничные леса занимают около 40 % всей лесопокрытой площади нашей страны [1]. Из 12 видов лиственниц, произрастающих в России, лиственница сибирская является наиболее часто встречающимся видом [2].

Лиственничные леса на территории Европейской части России встречаются, в основном, в её северных регионах - в Архангельской, Ленинградской и Вологодской областях, Республике Коми и очень ограниченно - в Республике Карелия. В Архангельской области им принадлежит 0,26 % лесопокрытой площади, в Республике Коми - 0,62 %. Лиственница сибирская занимает местоположения с более холодным климатом по сравнению с местообитаниями других видов лиственницы.

В промышленности активно используется только стволовая часть лиственницы, составляющая около 40 % биомассы дерева. Остаточный биоматериал (хвоя и побеги) относят к категории отходов и в промышленности не используется. Кроме того, на сегодняшний день проведено множество исследований химического состава древесины лиственницы, однако исследованию древесной зелени посвящено очень мало работ и поэтому отсутствуют разработанные технологические схемы ее переработки. Но как установлено многочисленными исследованиями других хвойных пород, именно древесная зелень является основным местом биосинтеза питательных веществ и соединений, выполняющих регуляторную функцию жизнедеятельности растения и защитную функцию. В летний вегетационный период сырьем являются охвоенные побеги, в осенний – побеги без хвои [2, 3].

Нейтральные компоненты

Как известно, существуют видовые различия химического состава растений. Однако, качественный состав компонентов различных видов лиственницы примерно одинаков, имеются различия лишь в количественном содержании отдельных компонентов.

Многолетние исследования нейтральных компонентов ДЗ лиственницы сибирской проведены в Сибирском государственном технологическом университете [3]. Учеными выявлены многие закономерности изменчивости содержания липидов, их группового состава, пигментов, витаминов Е, К и С, эфирного масла (ЭМ), минеральных веществ. Вклад липидов в древесной зелени

лиственницы существенно отличается от их содержания в охвоенных побегах других хвойных пород [4].

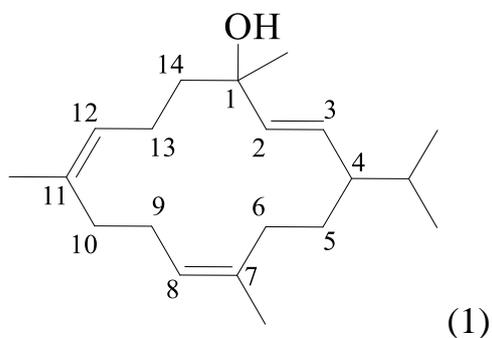
Из всех липидных компонентов при изучении древесной зелени хвойных пород, в том числе и лиственницы, наибольшее внимание уделялось исследованию ЭМ. Данные соединения имеют большое биологическое и практическое значение.

Средний выход ЭМ из хвои лиственницы сибирской составляет 0,4-0,5 % от массы сухого сырья [5, 6]. Так, компонентный состав ЭМ различных видов лиственниц, приводимый разными авторами, практически одинаков. В основном, оно представлено монотерпеновыми углеводородами, на которые приходится свыше 80% масла [5]. В работах [3, 6-8] изучен состав эфирных масел из ДЗ и отдельно из хвои и коры лиственницы сибирской. Главным компонентом ЭМ является 3-карен (8,0 % от суммы монотерпеновых углеводородов). Из кислородсодержащих соединений в лиственничном масле превалирует борнилацетат, сесквитерпеноидов – β -гумулен 18,7 % от массы эфирного масла [9].

Химический состав лиственницы исследуется и на Дальнем Востоке [10]. Авторами установлены различия в содержании эфирных масел в хвое, коре и древесной зелени летних и зимних образцов. Выход ЭМ из древесной зелени, отобранной в летнее время, в зависимости от региона произрастания, колеблется от 0,24 до 1,34 % от массы сухого сырья, что ниже чем у сырья, заготовленного в зимнее время 1,18-1,71 % (в зимнее время к ДЗ относятся кора и побеги) [11]. Это положение согласуется с рядом исследований [12, 13]. Лиственницы, произрастающие в районах с более суровыми климатическими условиями, содержат больше ЭМ, чем лиственницы из относительно мягкого климата, что свидетельствует о защитных функциях ЭМ. Следовательно, заготовка сырья для извлечения ЭМ и использования его в качестве товарной продукции наиболее целесообразна в осенне-зимние месяцы.

Известно, что среди нейтральных соединений в ДЗ лиственницы содержатся преимущественно монотерпеновые (α -терпинеол, терпинен-4-ол) и дитерпеновые спирты, в следовых количествах были идентифицированы ароматические спирты: *n*-цимен-7-ол и *n*-цимен-8-ол [14]. Впервые авторами работы [15] в древесине

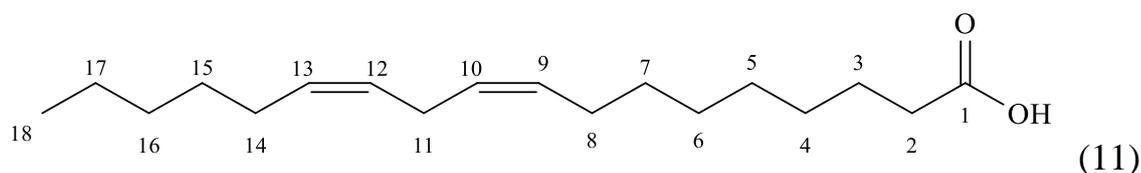
лиственницы был обнаружен изоцемброл (1) - дитерпеновое соединение, обладающее свойствами гормонального регулятора роста растений [16]. Ранее не было известно, что это соединение с необычной структурой, характерное для кедра сибирского, присутствует в лиственнице.

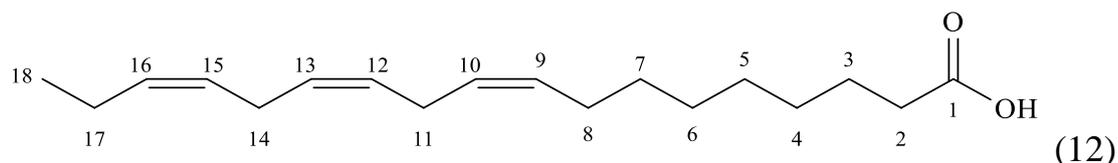


Помимо этого, для хвойных рода *Larix*, наиболее характерны бициклические дитерпеноиды эпиманоол, лариксол, эпиторулозол и лариксацетат, имеющие в лабдановом скелете гидроксильную группу при C₁₃. Эти соединения являются наиболее ценными для хемотаксономии хвойных рода *Larix* [9].

Кислые компоненты

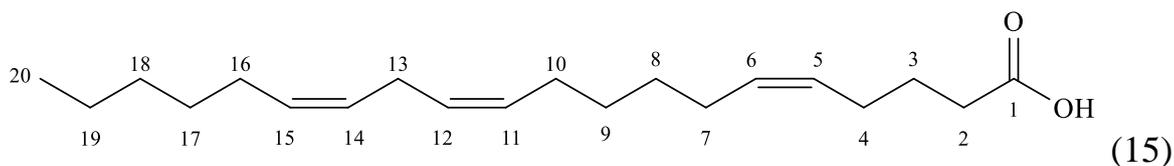
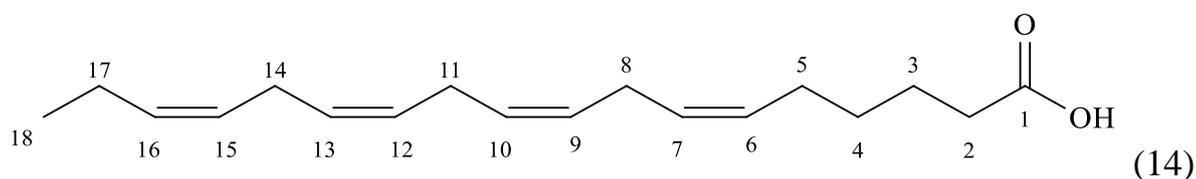
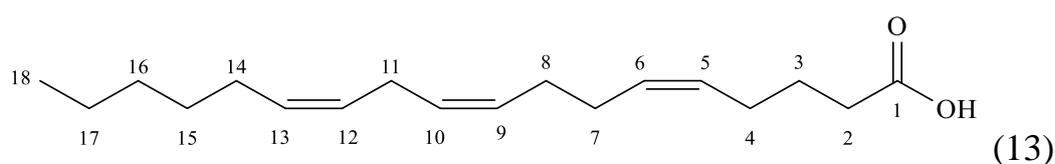
Большое внимание ученых уделяется изучению кислых компонентов биомассы лиственницы. Авторами работы [17] был оценен состав ЭВ, выделенных изопропиловым спиртом из хвои летнего и осеннего сбора. Установлено, что преобладают высшие жирные кислоты (ЖК) 1,76 % от массы сухого сырья. Содержание насыщенных кислот в группе свободных и «связанных» кислот составляет в зеленой хвое – 30,3 и 31,3 %, в желтой – 24,9 и 31,9 % соответственно. Среди насыщенных кислот идентифицированы тетрадекановая, пальмитиновая 17,7 % от суммы кислот, стеариновая 2,1 %, арахиновая 0,4 %, лигноцериновая 2,9 % кислоты. Ненасыщенные кислоты представлены в основном линолевой (11) и линоленовой (12) кислотами [17-19].





Арахидоновая кислота практически всегда присутствует во фракциях кислот из хвойных и лиственных пород деревьев. Содержание линоленовой кислоты в 2 раза выше в «связанных» кислотах, чем в свободных, при этом содержание в соответствующих группах кислот разного сбора хвои практически одинаково. В зеленой хвое линоленовой кислоты определено в 2–4 раза выше, чем в желтой хвое, и прослеживается увеличение в «связанных» кислотах, аналогично линоленовой кислоте. Высокое содержание линоленовой кислоты (39,0 – 40,6 % в «связанных» кислотах) не характерно ни для одной хвойной породы [17].

Наряду с распространенными ЖК: линолевой (8,2 % от суммы кислот) и линоленовой (2,1 %), являющимися главными среди ненасыщенных кислот древесных растений, компоненты фракции сложных эфиров хвои лиственницы содержат и редко встречающиеся 5,9,12- (13) и 6,9,12,15-октадеценовые кислоты (14). Кроме С-18 ненасыщенных кислот, среди соединений кислотной составляющей сложных эфиров идентифицирована 5,11,14-эйкозатриеновая кислота (15) [18].



Смоляные кислоты в основном являются представителями изоимарового ряда (изоимаровая (16), сандаракопимаровая (17)) и абиетинового типа (абиетиновая (18), дегидроабиетиновая (19) и левопимаровая кислоты (20)). В ДЗ *Larix sibirica* осеннего и летнего сбора наблюдается преобладание смоляных кислот (4,54 % от массы сухого сырья) абиетанового типа. Содержание дегидроабиетиновой кислоты возрастает с 4,68 % (летний сбор) до 20,7 % в хвое осеннего сбора, но снижается содержание абиетиновой кислоты (таблица 1) [17]. Этими же авторами во всех частях ДЗ обнаружена фракция полярных кислот в количестве до 25 % от суммы кислот [18].

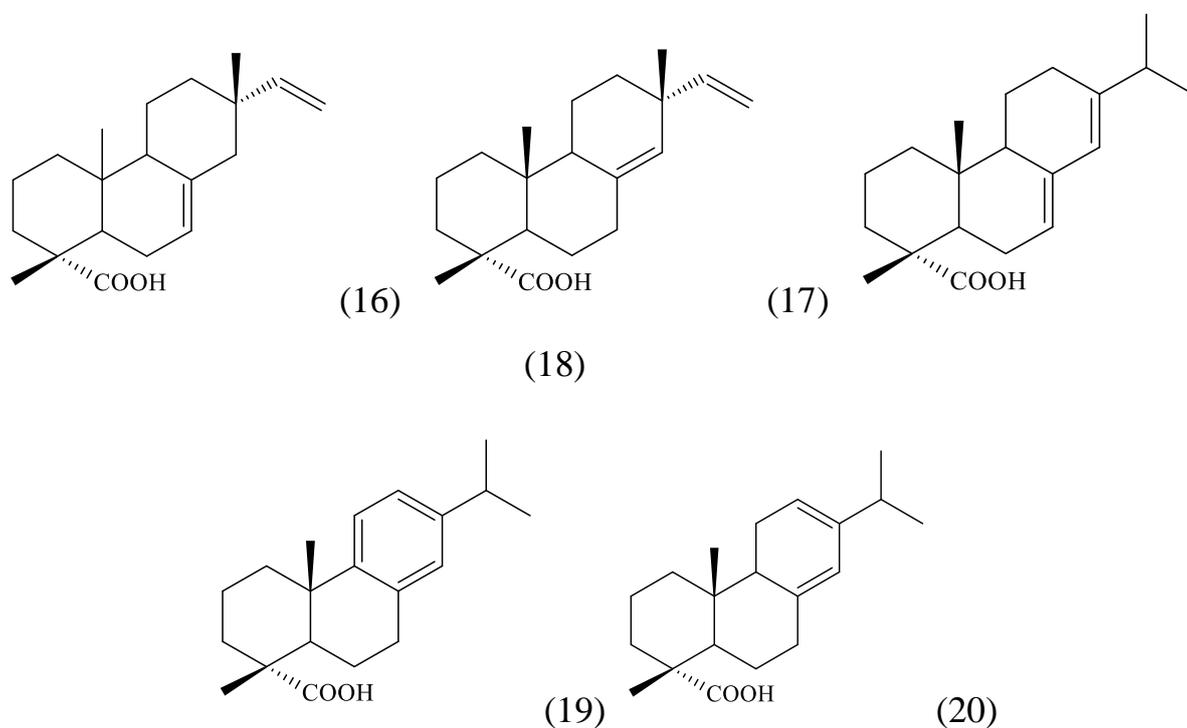


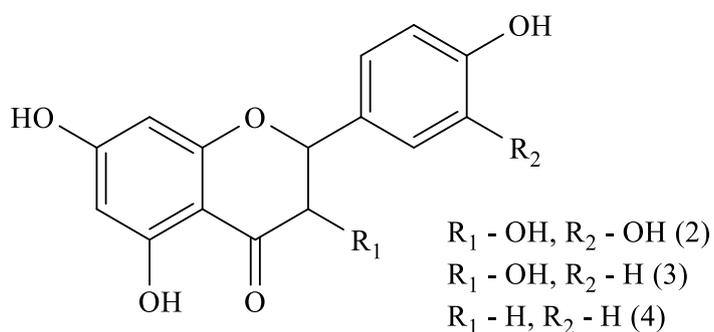
Таблица 1 – Состав смоляных кислот ДЗ лиственницы сибирской [20]

Кислота	Содержание, % от суммы смоляных кислот	
	Зеленая хвоя	Осенняя хвоя
Сандаракопимаровая	0,57	0,74
Изоимаровая	3,96	4,36
Левопимаровая	0,24	0,35
Дегидроабиетиновая	4,68	20,7
Абиетиновая	5,60	2,84

Из группы фенолокислот из ДЗ лиственницы сибирской выделены производные бензойной кислоты: *n*-гидроксibenзойная (0,19 % от массы сухого сырья), ванилиновая (0,11 %) и сиреневая (0,06 %), производные коричной кислоты: цис- и транс-коричная (0,29 %) и цис- и транс-*n*-кумаровая (0,85 %). Имеются сведения о нахождении сиреневой кислоты в лубе ствола *Larix sibirica* и *Larix dahurica*. Феруловая (0,09 %) и *n*-кумаровая кислоты найдены в каждой части кроны, коричная кислота — лишь в хвое и коре побегов. *Para*-кумаровая кислота доминирует среди кислот хвои лиственницы и ее доля в экстракте осенней хвои достигает 18 % от суммы ЭВ [14, 21]. Наибольшее их количество сосредоточено в побегах осеннего сбора и коре летних образцов.

Фенольные соединения

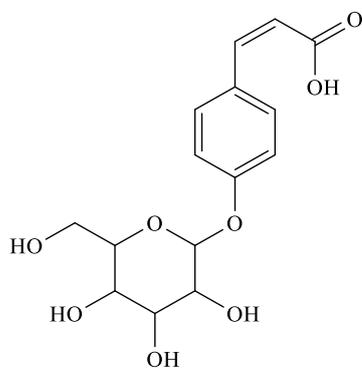
Флавоноиды в ДЗ лиственницы встречаются как в свободном виде, так и в виде гликозидов. Группой ученых под руководством В.А. Бабкина много лет проводятся исследования по технологии выделения дигидрокверцетина (ДКВ) (2) из древесины и коры лиственницы [15, 22-24]. Древесина лиственницы содержит до 3,5 % флавоноидов, которые представлены однотипными по химическому строению флавоновыми соединениями с преобладающим содержанием ДКВ (0,9 % от массы сырья) [23, 24]. Два других флавоноида - дигидрокемпферол (3) и нарингенин (4) являются биогенетическими предшественниками ДКВ.



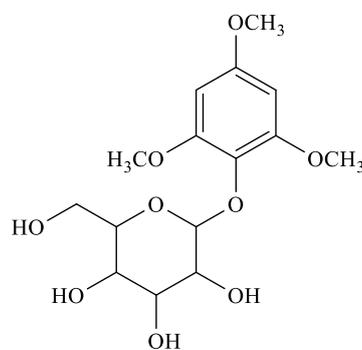
Исследования по изучению компонентного состава ДЗ лиственницы проводятся учеными в Санкт-Петербургском государственном лесотехническом университете под руководством В.И. Рощина. Их работы посвящены исследованию ЭВ различных частей кроны лиственницы в разные вегетационные периоды [6].

Согласно исследованиям, в осеннем сырье максимальное содержание фенольных соединений (2,9 % от массы сухого сырья) отмечено в побегах, по сравнению с хвоей и корой. При чем, их общее содержание в осеннем сырье больше, чем в летнем (1,2 %) [21, 25].

В хвое *Larix sibirica*, *Larix gmelinii*, *Larix decidua*, *Larix laricina* идентифицирован глюкозид *n*-кумаровой кислоты (5) [26]. В хвое лиственницы сибирской и даурской обнаружен глюкозид сиреновой кислоты (6) [27], что является необычным, т.к. для хвойных пород характерно гваяцильное замещение ароматического кольца в структуре фенольных соединений, в то время как для лиственных пород – сирингильное замещение.

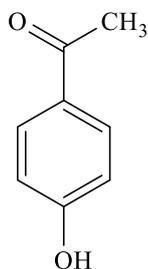


(5)

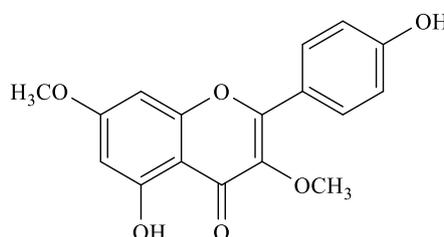


(6)

В хвое лиственницы сибирской и Гмелина обнаружен только один представитель ацетофенонов – *n*-гидроксиацетофенон (пицеол) (7) [28]. Авторами [25] впервые из хвои лиственницы сибирской был выделен флавоноид – куматакенин (8), обладающий фунгицидными свойствами [20, 29].

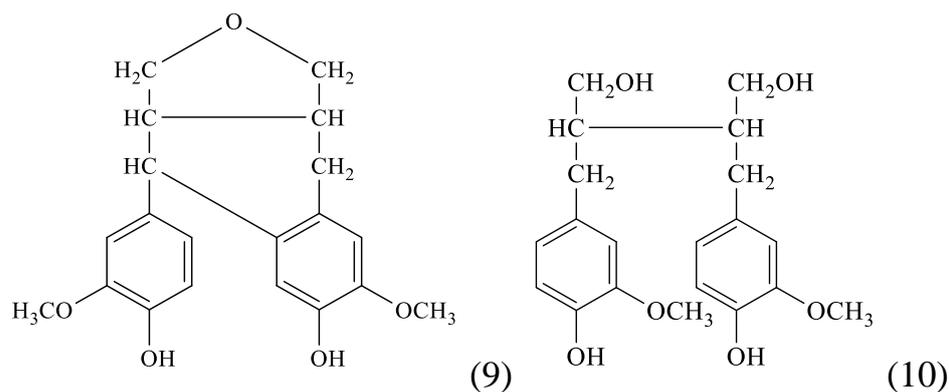


(7)



(8)

Основными компонентами смеси лигнанов в хвое и древесине лиственницы сибирской являются конидендрин (0,03 % от массы древесины) (9), и секоизоларицирезинол (0,06 %) (10) [14].



1.2 Химический состав сосны обыкновенной

Виды *Pinus* представляют собой вечнозеленые деревья группы смолистых хвойных пород семейства сосновые. *Pinus sylvestris* L. имеет широкое распространение по всему миру. Сосна обыкновенная *Pinus sylvestris* L. относится к подроду *Diploxylon*, секции *Pinaster*, подсекции *Lariciones*. Общая площадь сосновых лесов с *Pinus sylvestris* на территории России превышает 120 млн га [30].

Нейтральные компоненты

В состав нейтральной фракции ДЗ сосны входят такие классы соединений, как углеводороды, сложные эфиры, альдегиды и кетоны, спирты, полипренолы и другие соединения [31-33].

К наиболее важному классу биологически активных веществ ДЗ относятся эфирные масла [34]. Эфирное масло сосны – сложная смесь терпеновых углеводородов и их производных, сесквитерпеновых спиртов, простых и сложных эфиров, продуцируемых в условиях жизнедеятельности самого растения [35-37].

В работе [36] исследован состав эфирного масла хвой сосны обыкновенной, произрастающей в Красноярском крае, изучен его компонентный состав. Выход эфирного масла, определенный в пяти параллельных опытах, составил $(1,77 \pm 0,06)$ % от массы сухого сырья. Основными компонентами масла среди монотерпенов являются α -пинен (27,8 % от суммы ЭМ и 0,5 % от массы сухого сырья), камфен (3,92 % и 0,07 %), Δ^3 -карен (9,34 % и 0,16 %). Среди сесквитерпенов основные: β -кариофиллен (6,61 % и 0,12 %), Δ -кадинен (18,58 % и

0,33 %) и некоторые другие. Следует отметить, что содержание монотерпенов в эфирном масле сосны обыкновенной составляет менее половины – 49,4 %. Содержание описанных мажорных компонентов эфирных масел согласуется с другими работами [37, 38]. В составе эфирных масел хвои *P. sylvestris*, произрастающей в Англии, преобладал дитерпеноид изоабиенол (38,5 % от суммы ЭМ) и β- кариофиллен (19,0 %), за ними следуют монотерпены мирцен (15,1 %) и α-пинен (8,0 %) [39]. М. Karapandzova и др. [40] определили в составе эфирного масла хвои македонской сосны (*P. peuce*) дитерпеноиды (0,59 % от суммы ЭМ).

Высокое содержание в ДЗ сосны имеют полипренолы (0,3 - 1,0 % от массы сырья) [41, 42]. Впервые в хвое сосны обыкновенной полипренолы были найдены К. Hannus and G. Pensar в 1974 году [43]. Авторами была выделена фракция полиизопреноидов с выходом 1,0 % от массы сухого сырья. Извлечение проводили в аппарате Сокслета ацетоном и петролейным эфиром с дальнейшим анализом методами ВЭЖХ, масс-спектрометрии, ИК-спектроскопии и ГЖХ. Было установлено, что фракция состоит из полиизопренилацетатов с 10-19 изопреновыми звеньями преимущественно в цис-конфигурации.

Кислые компоненты

Содержание кислот в ДЗ сосны достигает по разным данным от 2,2 % до 5,8 % от массы сухого сырья. Кислоты находятся в хвое и побегах как в свободном состоянии, так и в виде эфиров. Содержание свободных кислот составляет около 3 %, а освобожденных – 2,8 % [44].

Сосна отличается от других видов хвойных высоким содержанием дитерпеновых кислот, составляющих до 3,0 % от массы сухого сырья. Фенолкарбоновые кислоты и их производные составляют лишь 0,05 - 0,07 % от массы сухого сырья [45, 46]. Дитерпеновые кислоты в большом количестве содержатся в хвое, а также в коре и тканях ксилемы, обычно в смоляных каналах. Из-за своей химической стабильности такие кислоты считаются ценными инструментами в таксономии сосны [31].

Основными составляющими кислых компонентов ДЗ сосны являются соединения лабданового типа. Авторы работы [47] выделили из петролейного экстракта хвои сосны обыкновенной соединения, общей структурной характеристикой которых является концевая двойная связь, расположенная в положении С-8: 15-норпинифоловую (21), эмплимбрикатоловую кислоты (22), 18 α -ацетоксилабд-8(16)-ен-15-овую кислоту (23) и 3 β -гидрокси-8(16), 13-лабдадиен-15-овую кислоту (24). Выходы выделенных соединений представлены в таблице 2.

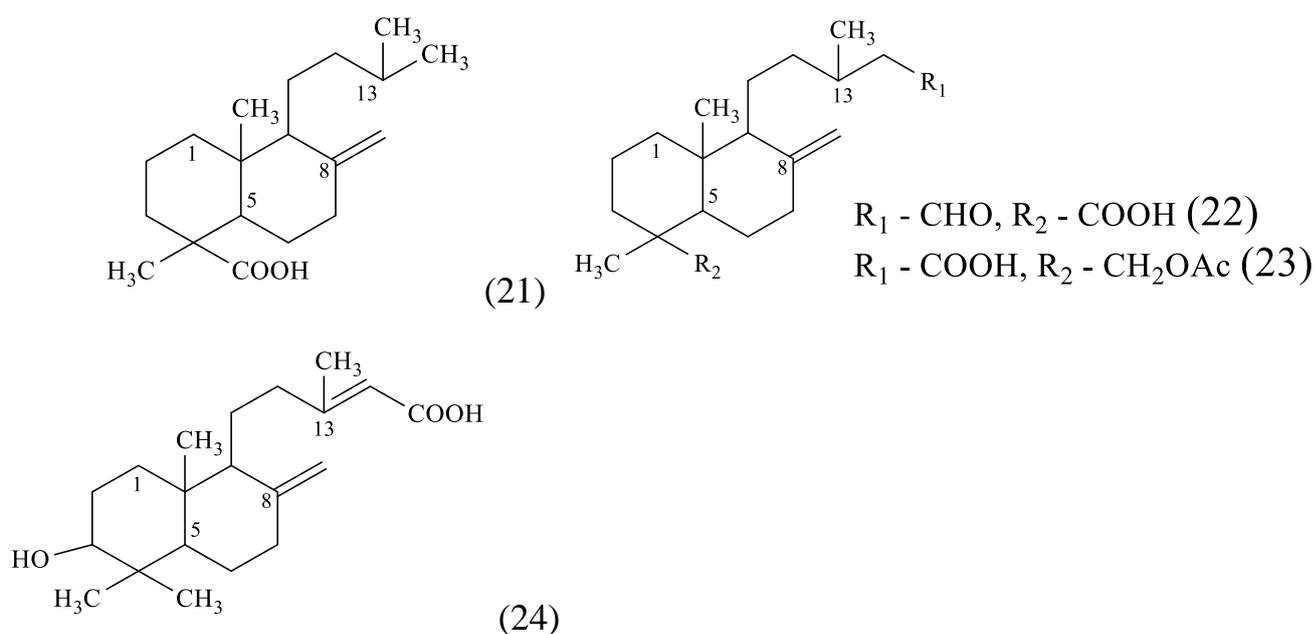


Таблица 2 – Содержание дитерпеноидов лабданового типа в хвое *Pinus sylvestris* (% от массы сухого сырья)

Соединение	Выход
15-норпинифоловая кислота	0,16
Пинифоловая кислота	0,80
Эмплимбрикатоловая кислота	0,33
Монометил пинифолат	0,77
18-ацетоксилабд-8(16)-ен-15-овая кислота	0,44
3 β -гидрокси-8(16), Е-13-лабдадиен-15-овая кислота	0,05

Соединения 23 и 24 были выделены из хвои *P. sylvestris* впервые.

Согласно исследованию [47], пинифоловая кислота и ее монометиловый эфир - это главный компонент хвои сосны обыкновенной, составляющий 60 - 70 % от общей суммы смоляных кислот. Пинифоловая (13S-лабд-8(17)-ен-15,18-диовая) кислота впервые была выделена ацетоном с выходом 0,27 % от массы сухого сырья из хвои *Pinus silvestris L.*, произрастающей в Швеции в 1962 году Enzell и Theander [48]. Структура пинифоловой кислоты определялась по спектральным данным: ИК в области 1642 см^{-1} и ЯМР ^{13}C в области 148 м.д. спектры указывают на наличие изолированной несимметрично дизамещенной двойной связи и после каталитической гидрогенизации над катализатором Адама получают дегидропинифоловую кислоту.

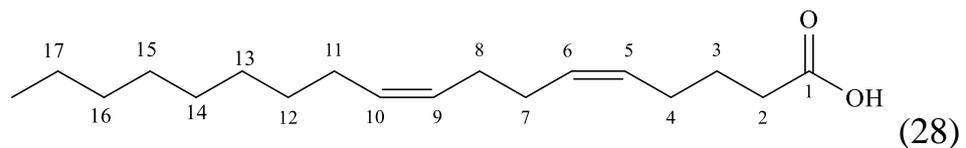
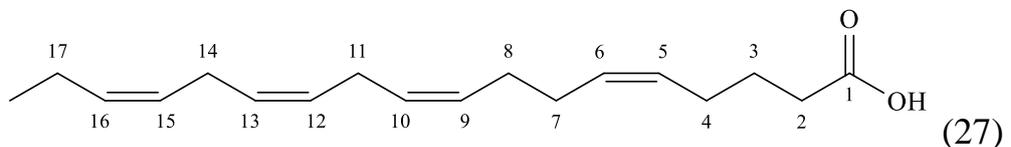
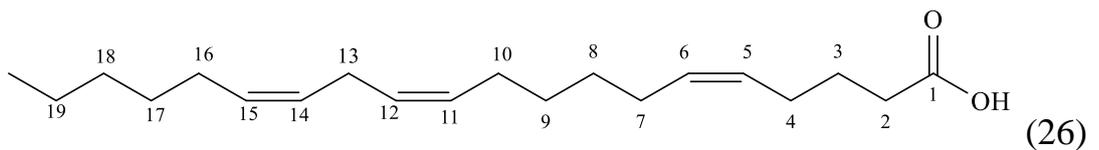
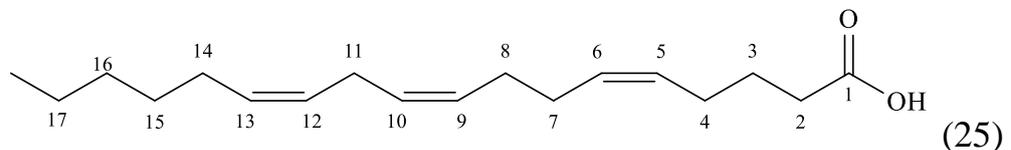
Позднее из хвои деревьев того же вида, произрастающих в Белоруссии, был выделен монометиловый эфир пинифоловой кислоты [49]. Для выделения хвою экстрагировали н-пентаном. Пинифоловая кислота была обнаружена авторами работы [50] в гексановом и толуольном экстракте хвои сосны обыкновенной. В составе ДЗ сосны содержится дегидропинифоловая кислота 0,01 % от массы сухого сырья, о которой впервые сообщили Norin и др. [51] в 1971 г.

В составе ЖК ДЗ *Pinus Silvestris* идентифицированы насыщенные пальмитиновая и стеариновая – 13 % и 8,7 % от суммы ЖК соответственно [52, 53]. Ненасыщенные ЖК представлены главным образом линолевой, олеиновой, линоленовой, 11,14-эйкозодиленовой и 5,9,12-окта-декадиеновой. Содержание насыщенных и ненасыщенных кислот в сырье близко 1:1.

Основной кислотой гексанового экстракта хвои сосны по данным финских авторов является α -линоленовая кислота [50]. Напротив, наиболее распространенной ЖК в гексановом экстракте была линолевая кислота [52]. Другими ЖК, идентифицированными в гексановом и толуольном экстрактах хвои сосны, были олеиновая, тридекановая и миристиновая кислоты. Несколько гидроксигирных кислот также были обнаружены в очень небольшом количестве, причем наиболее распространенным соединением в этой группе была 16-гидроксипальмитиновая кислота [50]. Имеются данные, что ДЗ сосны Центральной

Сибири свойственно более высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) – линолевой и α -линоленовой [53].

Одной из важных особенностей, характеризующих липиды хвои, является наличие $\Delta 5$ -полиметиленовых кислот. Эти ЖК характерны для хвойных [53-55]. Фракция $\Delta 5$ - полиметиленовых кислот образуется в основном за счет пиноленовой (25) и скиадоновой (26) кислот. В меньшей степени он образуется за счет конифероновой (27) и таксолеиновой (28) кислот. Было установлено, что сумма $\Delta 5$ - полиметиленовых кислот составляет 12,94 % от общего содержания ЖК [56].



Динамика содержания $\Delta 5$ -кислот повторяет общий характер изменения суммарного содержания ненасыщенных ЖК. Судя по литературным данным [55, 57], у *P. sylvestris* в Восточной Сибири было выявлено заметно более низкое содержание $\Delta 5$ -ЖК, чем у растений, произрастающих в криолитозоне Якутии, эта разница составила 27,5 мг/г в пересчете на сухую массу.

Фенольные соединения

В области хорошо изученных флавоноидных гликозидов существует группа соединений – их ацилированные производные. Ацилирование чаще

осуществляется оксиароматическими (*n*-кумаровая, феруловая), реже – карбоновыми кислотами (уксусная, малоновая). Авторы работы [58] из метанольного экстракта хвои сосны обыкновенной выделили O-ацелированные производные флавоноловых гликозидов: O-ацетилглюкопиранозид изорамнетина (29) (1,35 % от массы сухого сырья), O-ацетилгалактопиранозид изорамнетина (30) (27,0 % от массы сухого сырья), O-ацетилглюкопиранозид кверцетина (31) (6,8 % от массы сухого сырья) (рисунок 1).

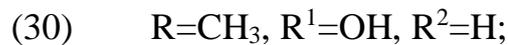
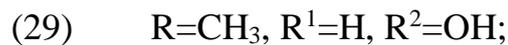
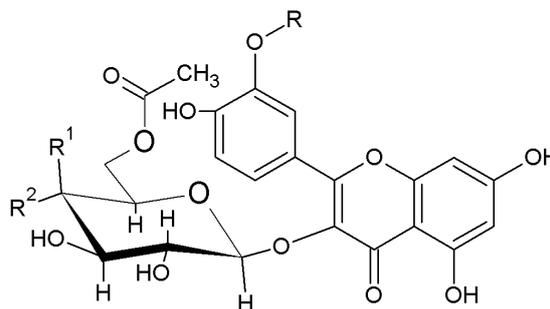
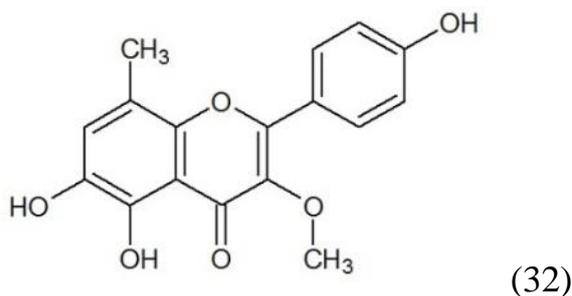


Рисунок 1 – Производные флавоноловых гликозидов

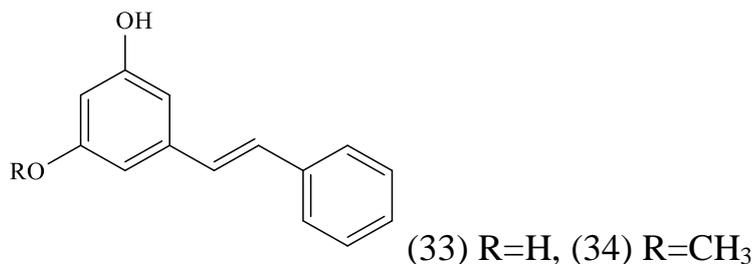
Среди природных флавоноидов С-метилированные производные составляют довольно малочисленную группу [59]. Из древесины некоторых видов *Pinus* были выделены криптостробин (5,7-диокси-6-метилфлаванон), стробопинин (5,7-диокси-6-метилфлаванон), стробобанксин (3,5,7-триокси-6-метилфлаванон), а из коры – пинокверцетин (6-метилкверцетин), пиномирицетин (6-метилмирицетин) [60].

Из хвои сосны обыкновенной авторы работы [61] выделили С-метилированный флавоноид силпин (5,6,4'-Триокси-3-метокси-8-метилфлаванон) (32). Это был первый случай обнаружения С-метилированных производных в хвойном растении. Силпин выделили из эфирной вытяжки

метанольного экстракта хвои сосны хроматографией на полиамиде в системе хлороформ : метанол (95:5). Выход составил 0,68 % от массы сухого сырья.



По данным исследований [62-64] доминирующими фенольными соединениями древесины сосны (8,8 % от массы сухого сырья) обыкновенной являются стильбеновые соединения – пиносильвин (33) и его производное, метилпиносильвин (34).



Шведскими учеными [65] был подробно проанализирован химический состав ЭВ луба сосны обыкновенной, являющейся для этой страны одним из основных лесобразующих и экономически значимых видов. В лубе были идентифицированы следующие соединения: гликозиды *n*-гидроксibenзойной кислоты (0,003 % от массы сухого сырья), *n*-кумаровой (0,006 %), флавоноиды – дигидрокверцетин (0,004 %), (+) – катехин (0,37 %), гликозид кемпферола (0,001 %), дигидроксикверцетина (0,07 %).

1.3 Биологическая активность компонентов ДЗ сосны и лиственницы

Природные соединения являются основным источником многих лекарственных средств, препаратов для сельского хозяйства и многого другого.

Эфирное масло растений рода *Pinus* и *Larix* обладает чрезвычайно разнообразной биологической активностью (антимикробной, противовоспалительной, противовирусной) и оказывают адаптогенное,

антиастматическое, антидепрессивное, антисептическое, антилейкодермическое, дезинфицирующее, болеутоляющее, противолучевое, противоопухолевое действие [66, 67], что дает значительный потенциал для разнообразия биотехнологического и медицинского применения.

Дитерпеноиды, входящие в состав ДЗ сосны и лиственницы, обладают противовоспалительной и противогрибковой активностью [68]. Данные соединения токсичны для микроорганизмов и членистоногих и поэтому играют важную роль в защите растений [68, 69]. Дитерпеновый спирт изоабиенол применяется как противомикробное [70] и противогрибковое средство [71].

Сумма кислот, выделяемых из хвои и побегов сосны обыкновенной, используется, как правило, всей совокупностью в виде составляющей хлорофиллокаротиновой пасты либо отдельно - в виде бальзамической пасты. Они употребляются в виде добавок в парфюмерии и животноводстве. Монометиловый эфир пинифоловой кислоты обладает сильными репеллентными свойствами против грызунов. Благодаря этим качествам, а также высокому содержанию в древесной зелени, он нашел широкое применение в качестве экологически нейтрального средства защиты растений [72]

Авторами работ [73, 74] установлена лейшманиальная, антимикробная и альдозоподавляющая активность пинифоловой кислоты. Цитотоксическую активность определяли в отношении следующих опухолевых клеточных линий: лимфоидные новообразования, рак легкого, рак толстой кишки и меланомы человека. Исследуемое соединение показало значительную лейшманиальную, антимикробную и альдозоподавляющую активность. Также, проводили определение минимальной ингибирующей концентрации данной кислоты в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибка *Candida Albicans*. Установлено, что пинифоловая кислота была неактивна в отношении всех микроорганизмов.

Установлено, что дегидроабиетиновая кислота улучшает протекание диабета и гиперлипидемию у тучных диабетических мышей [75] и стимулирует поглощение глюкозы у инсулинзависимых [76], проявляет противоязвенную,

противомикробную, противовирусную и противоопухолевую активность [77]. Применение дегидроабетиновой кислоты перспективно при лечении острых инсультов, эпилепсии, астмы, гипертензии, гипермотильности желудка и психозов. Авторы работы [78] полагают, что дегидроабетиновая кислота проявляет омолаживающий эффект.

Многие растительные фенольные соединения интересны с фармакологической и терапевтической точек зрения. Биологическую активность этих веществ, их растворимость в воде и способность проникать через клеточные стенки обуславливает наличие фенольного гидроксила в их молекулах [79]. Таофи́ и др. [80] установили, что *n*-кумаровая, протокатехиновая и коричная кислоты проявляют антитирозиназную, противомикробную и противовоспалительную активность. Кофейная кислота и, в большей степени, феруловая кислота, защищают кожу от эритемы, вызванной УФ-воздействием. Помимо антиоксидантов, эти две гидроксикоричные кислоты могут использоваться в качестве фотозащитных средств в косметических средствах для кожи [81].

Показано, что ванилиновая кислота обладает нейропротекторными свойствами против состояний цереброваскулярной недостаточности и сосудистой деменции [82]. Установлено, что смеси фенольных соединений, проявляют более высокую биологическую активность, чем отдельные соединения. Например, совместное применение сиригеновой кислоты, ресвератрола и галловой кислоты на крысах выявило антиоксидантную и кардиозащитную активность [83]. Ресвератрол обладает противоопухолевой, противовоспалительной активностью [84, 85].

Показаны антибактериальные и противовирусные свойства розмариновой кислоты [86, 87]. Пищевые пленки из розмариновой кислоты перспективны для упаковки пищевых продуктов и фармацевтических препаратов.

3,4-дигидроксибензойная кислота – это сильный антиоксидант, а также нейропротектор против β -индуцированного повреждения нейронов. Эту кислоту можно использовать в составах для борьбы с фитонематодами, поскольку она проявляет нематцидную активность против *M. incognita* [88].

В работе [64] приведены исследования антибактериальной активности пиносильвина, его монометилового эфира и экстракта из сучков сосны обыкновенной по отношению к трем видам бактерий (*Bacillus coagulans*, *Bukholderia multivorans* и *Alcaligenes xylosoxydans*). Установлено, что экстракт древесины *Pinus sylvestris* также, как и индивидуальные стильбены, эффективно ингибировал рост бактерий. Выявлено, что пиносильвин обладает более сильным антибактериальным действием, чем монометиловый эфир пиносильвина. Эта работа показывает, что экстракты, полученные из сучков видов *Pinus*, обладают хорошим потенциалом для использования в качестве природных биоцидов [89].

1.4 Методы переработки древесного сырья

Известны различные способы переработки древесной зелени хвойных с получением практически значимых продуктов [90, 91]. Общие методы извлечения ЭВ из растительного сырья включают традиционные методы, такие как экстракция органическими растворителями различной полярности, экстракция в аппарате Сокслета, или современные методы, такие как сверхкритическая и субкритическая экстракция, микроволновая экстракция и жидкостная экстракция под давлением. Разрабатывают экологически безопасные методы, потребляющие меньше энергии и меньше растворителя при одновременном получении более высоких выходов ЭВ.

Критерий выбора наилучшего метода экстракции основан на наибольшей степени извлечения ЭВ, для которой степень деградации соединений вследствие различных стадий процесса должна быть минимальной. Первостепенное значение при постановке задачи экстракционной переработки растительного сырья имеет выбор типа экстрагента [92, 93]. Основные требования, предъявляемые к растворителю (и/или к бинарным и тройным системам), заключаются в следующем. Экстрагент должен обладать высокой экстрагирующей способностью, быть химически индифферентным по отношению к целевым компонентам, стабильным к температурным и химическим воздействиям при условиях проведения экстракции. Важным условием использования растворителя являются

его малотоксичность, регенерируемость, пониженная взрыво- и пожароопасность [94].

Экстракция в аппарате Сокслета

Экстракция растворителем является наиболее распространенным методом извлечения ЭВ. В настоящее время используются различные типы методов экстракции растворителем, из которых метод извлечения в аппарате Сокслета является наиболее широко используемым лабораторным методом, главным образом из-за простоты использования и эффективности. За счет продолжительности процесса данный метод позволяет извлекать наибольшее количество ЭВ. Его преимущество состоит в том, что он совмещает в себе настаивание и дефлегмацию.

В качестве экстрагента чаще всего используются спирты (метанол, этанол), ацетон, диэтиловый эфир и этилацетат. Однако очень полярные фенольные кислоты (бензойная, циннамовая) не могут быть полностью экстрагированы чистыми органическими растворителями, поэтому рекомендуются смеси спирт-вода или ацетон-вода. Менее полярные растворители (дихлорметан, хлороформ, гексан, бензол) пригодны для экстракции неполярных соединений (воски, масла, стерины, хлорофилл) из растений [95].

Backlund и др. [96] проведено выделение и определение количества ЭВ в надземных частях сосны обыкновенной (верхушка и основание ствола, кора, ветви, хвоя и шишки) гексаном в аппарате Сокслета. Выходы экстрактивных веществ в различных частях существенно различались: из коры 13-20 %, из ветвей и хвои 4-10 % от массы сухого сырья.

В работе С.В. Соболева и др. [97] рассмотрены вопросы по переработке коры осины с выделением биологически активных веществ. В качестве экстрагента использовали водно-этанольные растворы различной концентрации. Определен оптимальный режим проведения экстракции: концентрация этилового спирта – 65 %, продолжительность процесса – 3,5 ч, гидромодуль (ГМ) (соотношение объема растворителя к массе сырья) – 15:1. Анализ экстракта показал содержание

дубильных веществ (таннины – от 17,0 до 18,0 % от массы сухого сырья), полифенолы (гликозиды – 0,71–0,84 %), флавоноиды (0,33–0,43 %), а также пигменты (хлорофиллы – от 0,63 до 0,74% и каротиноиды - от 0,52 до 0,55 %). Общий выход составил 30,0 % от массы сухого сырья.

Основным недостатком экстракции растительного сырья в аппарате Сокслета является использование токсичных и пожароопасных растворителей, сочетание длительности экстракции и высокой температуры, которые влияют на извлечение в основном термолабильных компонентов [98]. Несмотря на это, экстракция органическими растворителями в аппарате Сокслета до сих пор является традиционным лабораторным методом, используемым для сравнения эффективности новых методов экстракции.

Экстракция ультразвуком

Ультразвуковая экстракция - это метод, который все чаще используется в химической и пищевой промышленности [99]. Он нашел широкое применение в переработке растительного сырья, используемый при получении эмульсий, суспензий, т.е. там, где ультразвук непосредственно контактирует через жидкую фазу с сырьем [100-102].

Применение ультразвука позволяет увеличить скорость протекания процесса экстрагирования, увеличить выход ЭВ, является методом выделения термолабильных компонентов, поскольку рабочая температура может оставаться низкой в течение всего процесса [98]. Ультразвук усиливает в тканях проницаемость клеточных мембран и диффузные процессы. Кавитационное воздействие УЗ волн облегчает высвобождение экстрагируемых соединений, что увеличивает скорость массопереноса и приводит к повышению эффективности экстракции и / или сокращению продолжительности экстракции [103]. Однако, с увеличением продолжительности и интенсивности озвучивания степень деструкции веществ увеличивается, но процесс деструкции может быть приостановлен или замедлен добавлением стабилизаторов, антиоксидантов или консервантов [104].

Полярность используемого растворителя является одной из важных характеристик, определяющих эффективность УЗ экстракции. Чаще всего для выделения ЭВ из растительного сырья с использованием УЗ используют этанол, метанол, н-бутанол, изопропанол, гексан, ацетон, ацетонитрил, этилацетат, дихлорметан, диэтиловый эфир [105, 106]. Метанольные растворы извлекают различные классы соединений высокой полярности, и лучше всего подходят для извлечения низкомолекулярных полифенолов, в то время как водно-ацетоновые растворы более эффективны для растворения флаванолов с высокой молекулярной массой (например, конденсированные дубильные вещества) [107].

Нарчуганов А.Н. и др. [108] исследовали закономерности извлечения биологически активных веществ из ДЗ пихты сибирской и можжевельника сибирского с использованием этилового спирта. Выход ЭВ при УЗ обработке и температуре 50 °С, продолжительность экстракции 60 мин, гидромодуле 10:1 составил из ДЗ пихты 24,5 % от массы сухого сырья, из можжевельника – 24,1 %.

R.E. Ghitescu и др. [109] проводили ультразвуковую экстракцию фенольных соединений из коры ели этанолом. Максимальный выход 1,3 % от массы сухого сырья суммарных полифенолов был получен при продолжительности процесса 60 мин, температуре экстракции 54 °С и концентрации этанола 70 %.

Метод УЗ экстракции применен для извлечения фенольных соединений из шишек кедра (*Cedrus atlantica* Endl.), лиственницы (*Larix decidua* Mill.), ели (*Picea abies* H. Karst.), сосны (*Pinus nigra* J. F. Arnold), пихты (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb. Франко), произрастающих в Венгрии. Экстракцию проводили 20 %-ми водными растворами этанола, метанола и ацетона. Продолжительность экстракции составляла 10, 20 и 30 мин, температура 25 °С. Установлено, что раствор ацетона является наиболее эффективным растворителем для извлечения полифенолов. При двадцатиминутной обработке выход полифенолов из пихты составил – 3,78 % от массы сухого сырья, сосны – 5,3 %, кедра – 3,2 %, ели – 8,4 %, лиственницы – 5,9 %. Выход полифенолов в этаноле составил из пихты – 3,3 %, сосны – 4,5 %, кедра – 1,8 %, ели – 5,2 %, лиственницы – 3,2 %. При экстракции метанолом получили из

пихты - 2,13 %, сосны – 4,62 %, кедра – 2,47 %, ели – 6,67 %, лиственницы – 1,14 % [110].

Таким образом, экстракция низкомолекулярных соединений из растительного сырья с применением ультразвуковой обработки является перспективным методом. Большинство ученых преследуют цель повысить извлечение фенольных соединений с использованием ультразвука при варьировании параметров экстракции, таких как продолжительность ультразвукового воздействия и характер растворителя.

Сверхкритическая экстракция

Сверхкритическая экстракция (СКЭ) является одним из популярных методов, применяемым для извлечения биологически активных соединений из растительного сырья [111]. Сверхкритическое состояние достигается тогда, когда и температура, и давление поднимаются выше своего критического значения [112].

Обычно используемым растворителем в СКЭ является CO_2 , который обладает рядом уникальных характеристик и физико-химических свойств. Диоксид углерода при давлении, превышающем 7,6 МПа, и температуре более 31,1 °С переходит в сверхкритическое состояние, имея при этом плотность как у жидкости, а вязкость как у газа. При этом CO_2 обладает низкой токсичностью, невоспламеняемостью, химической инертностью, доступностью и экологической безопасностью [113]. Сверхкритический CO_2 способен полностью или выборочно извлекать любые неполярные компоненты, такие как альдегиды, терпеновые соединения, кетоны, жирорастворимые витамины, сложные эфиры и спирты, высокомолекулярные насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, белки, крахмалы, сахара, гликозидные вещества, минеральные соли и вода являются нерастворимыми в жидком CO_2 [114].

В основном, метод СКЭ используется для извлечения эфирного масла из растений. Эфирные масла, выделенные CO_2 экстракцией, превосходят свои аналоги, которые выделены путем паровой дистилляции и экстракцией растворителями. Полученные с помощью CO_2 экстракты не содержат остаточных

количеств растворителя и не требуют очистки [115, 116]. СКЭ с использованием CO_2 имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами экстракции, включая проведение процесса извлечения ЭВ при низких температурах и сохранение термически лабильных компонентов в экстрактах.

Akanda M.J. и др. [111] заявили, что СКЭ является идеальным методом для выделения пальмового масла в промышленных масштабах. Метод СКЭ с использованием сверхкритического CO_2 (СК- CO_2) в качестве растворителя может уменьшить количество сточных вод по сравнению с традиционной экстракцией органическим растворителем. Использование метода экстракции СК- CO_2 сохраняет уникальный вкус и аромат выделяемых масел, в то время как летучие ароматические соединения обычно теряются во время традиционной экстракции растворителями.

Часто сравнивают два метода экстракции: сверхкритическим CO_2 и экстракцию в аппарате Сокслета органическими растворителями. Bukhanko и др. [117] проведено сравнение двух технологий выделения ЭВ из шишек, ветвей, хвои и коры норвежской ели. Для извлечения липофильных соединений обычную экстракцию в аппарате Сокслета проводят смесью петролейного эфира и ацетона в соотношении 9:1. Экстракцию с использованием диоксида углерода проводили в динамическом режиме в течение 2 ч при следующих условиях: давление 40 МПа, температура 60 °С (для хвои); 30,4 МПа, 50 °С (шишки, ветки и кора). Выход ЭВ составил из ветвей - 5,3 %, из хвои 3,3 % и коры 2,4 %. При экстракции коры и хвои в аппарате Сокслета выход ЭВ 4-5 % от массы сухого сырья, из шишек 2,2 %.

Французскими учеными проведено сравнение нескольких методов: паровой дистилляции, экстракции ацетоном в аппарате Сокслета и сверхкритическим CO_2 (СК- CO_2) ДЗ пихты (*Abies Alba*), ели (*Picea abies*) и сосны (*Pinus pinaster*) [118] (таблица 3).

Установлено, что наиболее эффективно ЭВ ДЗ ели и сосны выделяются сверхкритическим CO_2 , из ДЗ пихты выход ЭВ одинаков в аппарате Сокслета и СК- CO_2 .

Таблица 3 - Выход ЭВ, полученных различными методами

Сырье	Выход экстрактивных веществ (г / 100 г сырья)		
	В аппарате Сокслета	Паровая дистилляция	СК-СО ₂
ДЗ пихты	4,9	0,7	4,8
ДЗ ели	4,8	5,1	5,9
ДЗ сосны	5,7	6,6	7,4

Татаринцева В.Г. и др. [119] проводили оценку влияния метода экстракции на выход и состав спиртовых экстрактов ДЗ ели европейской (*Picea Abies*), произрастающей на территории Архангельской области. Спиртовые экстракты получали тремя методами: настаиванием, в аппарате Сокслета и дефлегмационным методом. Экстракция методами настаивания и дефлегмационным методом проведена в течение 2,5 ч при температуре 90 °С. В аппаратах Сокслета была проведена исчерпывающая экстракция в течение 10 ч. Содержание липидов в экстрактах составило 9,8 % от массы сухого сырья. Методом настаивания выделено ЭВ – 28,3 % от массы сухого сырья, в аппарате Сокслета – 36,1 % и дефлегмационным методом – 36,0 %.

Недостатки метода СКЭ заключаются в неполярной природе СО₂, что делает невозможным его применение для выделения полярных соединений. Однако эту проблему можно решить путем добавления соразтворителей [120], таких как метанол, этанол, ацетонитрил, ацетон, вода, этиловый эфир и дихлорметан [119]. Это увеличивает полноту извлечения ЭВ методом СКЭ.

Сверхкритический СО₂ был использован для извлечения низкомолекулярных фенольных и липофильных соединений из древесины *Pinus Pinaster* [112]. Экстракцию сырья проводили при 10-25 МПа и 30-50 °С с добавлением этанола в качестве соразтворителя (в диапазоне 5-20%). Выход ЭВ и концентрация фенольных соединений в полученных экстрактах увеличились по сравнению с экстракцией чистым СО₂. При экстракции сырья в оптимальных условиях при 25 МПа, 50 °С, 10 %-ым этанолом выход составил 4,1 % от массы сухого сырья. Выход ЭВ при экстракции чистым СО₂ – 2,5 %.

Talmaciu A.I. и др. [121] выделяли биологически активные фенольные соединения из коры ели (*Picea abies*) в два этапа, используя сверхкритические жидкости. На первой стадии эксперимента был использован только CO₂ для удаления воска и летучих эфирных масел. На втором этапе сырье подвергалось воздействию CO₂ с 70 %-ым этиловым спиртом. При проведении экстракции сверхкритическим CO₂ максимальный выход липофильных соединений (2,08% от массы сухого сырья) достигался при давлении 20 МПа и температуре 50 °С. При повышении температуры до 60 °С выход ЭВ составил 0,7 %. Снижение выхода является следствием снижения плотности CO₂ при повышении температуры [122]. После удаления липофильных соединений на второй стадии было установлено, что при увеличении давления от 10 МПа до 15 МПа, общий выход ЭВ увеличивается от 23,0 % до 25,9 %. Дальнейшее повышение давления до 20 МПа снижает выход ЭВ до 0,8 %. Двухэтапная процедура извлечения ЭВ позволяет отделить липофильные соединения от фенольных соединений. Максимальный выход фенольных соединений составил 30,4 % при давлении 10 МПа и температуре 40 °С. Общее содержание фенолов составило 314,49 мг/г сухого экстракта, флавоноидов - 100,67 мг/г и дубильных веществ - 26,38 мг/г сухого экстракта. Феруловая и *n*-кумаровая кислота являются основными в полученных экстрактах [121].

Аналогичные результаты были отмечены и авторами работы [123]. Использование этанола в качестве соразтворителя к сверхкритическому CO₂, увеличило выходы фенолов из коры сосны *Pinus brutia*. Опыты проводили при давлении 20 МПа, температуре 60 °С и соотношении растворитель/исходное сырье 30:1. Общий выход катехинов при экстракции сверхкритическим CO₂ составил 0,021 % от массы сухого сырья, а с использованием соразтворителя в количестве 3 % получено 1,5 %.

Seabra и др. [124] отметили, что большее количество этанола, добавляемого в качестве соразтворителя CO₂ (70/30 этанол/CO₂), повышает выход фенольных соединений из коры сосны *Pinus Maritima* (25,6 %), аналогично полученным при экстракции этанолом в аппарате Сокслета (26,0 %). СКЭ проводили при давлении 25,1 МПа, температуре 29,8 °С в течение 210 мин, экстракцию в аппарате Сокслета

проводили с использованием этанола при ГМ 50:1 в течение 120 мин при температуре кипения растворителя.

Помимо CO₂ в методе СКЭ используют воду в качестве растворителя. Этот метод также известен как подкритическая экстракция или экстракция горячей водой под давлением [125]. Вода теряет свою эффективную полярность при высоких температурах 150-250 °С, благодаря этому в ней растворяются как полярные, так и неполярные соединения [126]. Liu J. и др проводили извлечения бетулиновой кислоты из коры березы методом субкритической водной экстракции [127]. При оптимальных условиях: продолжительность экстракции 27 мин, температура 184,5 °С, ГМ 60:1 и давление 2,0 Мпа максимальный выход бетулиновой кислоты составил 0,28 % от массы сухого сырья.

Микроволновая экстракция

Микроволновая экстракция (МВЭ) достаточно активно используется при выделении различных низкомолекулярных органических соединений из природного сырья, и прежде всего растительного.

При микроволновом излучении происходит разрушение слабых водородных связей, чему способствует дипольное вращение молекул с выделением тепла. При этом происходит миграция растворенных ионов, что увеличивает проникновение растворителя в растительное сырье, тем самым облегчая выделение целевых соединений [128]. В процессе микроволновой обработки внутри сырья образуется давление, которое изменяет физические свойства биологических тканей, улучшая пористость растительного сырья, что позволяет лучше проникать экстрагирующему растворителю внутрь сырья [129, 130].

Для МВЭ рекомендуется использовать водные растворы этанола, метанола и ацетона. [131]. Оптимальным значение ГМ является от 10:1 до 20:1 [132, 133].

Авторы работы [134] проводили сравнение выходов ЭВ и антиоксидантной активности экстрактов из листьев *Pistacia lentiscus* var (мастичное дерево), полученных методом экстракции в аппарате Сокслета, микроволновой экстракции, экстракции ультразвуком, а также сверхкритической жидкостной экстракции.

Эффективность и селективность процессов определяли по показателям выхода ЭВ и антиоксидантной активности. Экстракцию в аппарате Сокслета проводили следующими растворителями: *n*-гексан, этилацетат, этанол, вода. Растворителем для микроволновой экстракции была вода. Экстракцию с помощью ультразвука проводили в ультразвуковой ванне с использованием этанола и воды. Наибольший выход ЭВ достигался методом микроволновой экстракции водой (48,1 % от массы сухого сырья), далее следовал метод ультразвуковой экстракции (39,39 %) и экстракции в аппарате Сокслета с использованием воды в качестве растворителя (31,99 %).

Таким образом, подводя итоги по методам экстракции растительного сырья следует отметить, что в каждом из используемых методов есть свои преимущества и недостатки.

Метод экстракции растительного сырья органическими растворителями в аппарате Сокслета довольно простой, эффективный, способный обеспечить исчерпывающее извлечение ЭВ. Но существенным недостатком является длительность и высокая температура процесса, что может вызвать термическое разложение термолабильных соединений. Использование же ультразвуковой обработки может обеспечить интенсификацию процесса извлечения ЭВ, а также сокращение продолжительности технологического процесса. Однако, недостатком этого метода является то, что ультразвуковое воздействие, используемое для обработки растительного сырья, является очень мощным и проведение процесса в этих условиях может вызывать разрушение некоторых классов биологически активных веществ. Эти обстоятельства заставляют более осторожно относиться к использованию ультразвука и тщательно изучать его действие.

Сверхкритическая экстракция CO₂ является экологически чистым и эффективным методом экстракции неполярных соединений, однако, для экстракции полярных веществ, эффективность этого метода может быть относительно низкой. Также недостатком является сложность оборудования, работающего под давлением. Метод МВЭ может применяться для извлечения как

полярных, так и неполярных соединений с различными комбинациями растворителей и извлекать ЭВ с высокими выходами.

Заключение

1. На сегодняшний день изучению химического состава древесины лиственницы посвящено множество исследований, однако исследованию древесной зелени посвящено очень мало работ. В основном, внимание ученых уделяется изучению эфирных масел и фенольных соединений, входящих в состав хвои, коры, древесины.

2. ДЗ сосны привлекает ученых своим высоким содержанием дитерпеновых, жирных кислот и флавоноидов. Изучению состава эфирного масла хвои сосны северных регионов посвящено большое количество работ.

3. Работы ученых свидетельствуют о высокой биологической активности компонентов ДЗ сосны и лиственницы и их эффективности при лечении целого ряда заболеваний.

4. Критерием выбора наилучшего метода экстракции растительного сырья основан на простоте технологического процесса и наибольшей степени извлечения экстрактивных веществ. Наряду с классическими методами экстракции растительного сырья используются современные методы с применением микроволнового излучения, ультразвука, сверхкритических жидкостей.

ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2.1 Приборы и реактивы

Для эмульсионной экстракции использовали лабораторный экстрактор объемом 1 л с механической мешалкой (скорость 1000 об/мин), роторно-пульсационный аппарат (РПА), и аппарат гравитационного типа (АГТ) объемом 500 л.

Растворители упаривали на роторном испарителе Laborota 4000 efficient.

Анализ ЭВ осуществляли методом ТСХ на пластинках сорбфил (элюент петролейный эфир:диэтиловый эфир и хлороформ:этанол). Обнаружение компонентов проводили путем опрыскивания пластин проявляющим раствором. В качестве реагентов для проявления использовали:

а) раствор перманганата калия (15 г KMnO_4 , 300 cm^3 воды, 1 cm^3 концентрированного раствора H_2SO_4) без нагревания;

б) раствор ванилина (3 г ванилина, 1,3 cm^3 концентрированного раствора H_2SO_4 , 127 cm^3 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, массовая доля этанола в растворе $\omega(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 95\%$) с нагреванием.

Для разделения кислот методом колоночной хроматографии использовали силикагель марки Alfa Aesar (70-230 mesh).

ИК-спектры записывали на приборе IR Prestige-21 (Shimadzu) со спектральным диапазоном 400-4000 cm^{-1} , твердые вещества в таблетках KBr, жидкие вещества в тонком слое.

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C полученных веществ записывали на спектрометре BRUKER-300, в качестве внутреннего стандарта использовали сигнал растворителя CHCl_3 ($\delta_{\text{H}} 7,21$ м.д, $\delta_{\text{C}} 76,90$ м.д.).

Анализ ГЖХ-МС проводили на хроматографе Shimadzu GCMS-QP2010Plus. Идентификацию компонентов проводили путем сравнения полученных результатов с литературными данными, сведениями из банка данных и с данными эталонных образцов соединений.

2.2 Подготовка сырья к экстракции

Объектом исследования являлась ДЗ лиственницы сибирской *Larix sibirica* (Ledeb.) и сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. ДЗ сосны заготавливали в пригородных лесах г. Сыктывкара, лиственницы - в пригородных лесах г. Печора в июле, августе и сентябре. ДЗ лиственницы делили на две части: летняя часть (сбор июль и август) — побеги с зеленой хвоей, осенняя (сбор сентябрь) — желтая хвоя и обесхвоенные побеги.

На следующем этапе сырье сушили на воздухе естественным образом до влажности 2-3 %. Размол веток проводили на режущем барабане, где происходит предварительное измельчение до фракции 20-80 мм. Далее измельченную режущим барабаном ДЗ подавали на шнековый измельчитель. В нем сырье подвижными ножами измельчали до фракции 0,5-3,0 мм. Измельченное сырье хранили в морозильной камере. Перед проведением опытов определяли влажность сырья по методу Дина и Старка [135].

2.3 Эмульсионный способ выделения экстрактивных веществ

Каждый эксперимент эмульсионной экстракции исследуемого растительного сырья проводили в трех повторностях. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакетов программ Microsoft Office Excel 2007. Экспериментальные данные представлены в виде среднеарифметических значений с указанием стандартной ошибки выборки.

Эмульсионная экстракция низкомолекулярных соединений из ДЗ сосны в лабораторном экстракторе

100 г измельченной ДЗ влажностью 50 % смешали с 500 мл 3 %-го раствора гидроокиси натрия (гидромодуль 10:1) при комнатной температуре, настаивали 60 мин. Затем смесь перемешивали механической мешалкой в течение 30 мин. Полученную гетерогенную смесь отфильтровали на воронке Бюхнера.

Водный раствор, полученный после фильтрации, перенесли в делительную воронку и экстрагировали три раза петролейным эфиром при соотношении раствор : петролейный эфир, равном 3:1 для извлечения нейтральных компонентов (Н.К.). Эфирный экстракт промыли дистиллированной водой до нейтральной реакции, сушили над безводным Na_2SO_4 и полностью отогнали петролейный эфир на роторном испарителе. В результате получили концентрат Н.К.

Водно-щелочной раствор подкислили 12 %-ым раствором серной кислоты до достижения $\text{pH}=2-3$ и экстрагировали три раза диэтиловым эфиром при соотношении раствор : диэтиловый эфир, равном 3:1 для извлечения кислых компонентов (К.К.). Эфирный экстракт промыли дистиллированной водой до нейтральной реакции, сушили безводным сульфатом натрия и полностью удалили диэтиловый эфир на роторном испарителе. Получили сумму К.К.

Опыты проводили в трехкратной повторности с варьированием значений гидромодуля (от 7:1 до 13:1) и концентрации NaOH (от 3,6 до 6,4 %).

Эмульсионная экстракция низкомолекулярных соединений из ДЗ лиственницы в лабораторном экстракторе

В качестве сырья использовали ДЗ лиственницы в разные периоды вегетации. ДЗ делили на две части: летняя часть (сбор июль и август) — побеги с зеленой хвоей, осенняя (сбор сентябрь) — желтая хвоя и обесхвоенные побеги.

100 г измельченной ДЗ влажностью 50 % смешали с 500 мл 5 %-го раствора гидроокиси натрия (гидромодуль 10:1) при комнатной температуре, настаивали 60 мин. Затем смесь перемешивали механической мешалкой в течение 30 мин. Полученную гетерогенную смесь отфильтровали на воронке Бюхнера. Выходы ЭВ определяли, суммируя К.К. и Н.К., выделенные из полученного эмульсионного экстракта.

Эмульсионная экстракция низкомолекулярных соединений из ДЗ сосны и лиственницы в роторно-пульсационном аппарате

4,5 л 5 %-го водного раствора NaOH заливали в стеклянную ёмкость объемом 10 л и включали электродвигатель роторно-пульсационного аппарата (РПА). В ёмкость с водно-щелочным раствором загружали 300 г сырья (гидромодуль 15:1) и проводили обработку в течение 15 мин. Контроль температуры вели каждые 5 мин. После окончания экстракции электродвигатель выключали, из патрубков и рабочей камеры сливали гетерогенную смесь, которую фильтровали через капроновый фильтр. Получили 3 л экстракта.

Последующие опыты экстракции ДЗ сосны проводили аналогично, изменяя гидромодуль от 10:1 до 15:1 и продолжительность обработки от 15 до 30 мин. Экстракцию ДЗ лиственницы проводили при концентрации NaOH от 4 % до 7 %, ГМ от 10:1 до 14:1 и продолжительности обработки от 10 до 25 мин. Выходы ЭВ определяли, суммируя К.К. и Н.К., выделенные из полученного эмульсионного экстракта.

Эмульсионная экстракция низкомолекулярных соединений из ДЗ сосны и лиственницы в аппарате гравитационного типа

19,8 кг исследуемого сырья влажностью 40 % загружали в аппарат гравитационного типа (АГТ), заливали 200 л 5 %-го водного раствора NaOH температурой 50 °С (гидромодуль 10:1), экстрактор закрывали и включали перемешивание. Процесс проводили в течение 4 ч. По завершении экстракции фильтровали полученную гетерогенную смесь через встроенный в крышку аппарата фильтр. Объем полученного экстракта 165 л. Последующие опыты проводили аналогично, меняя концентрацию щелочного раствора от 4 до 5 %. Выходы ЭВ определяли, суммируя К.К. и Н.К., выделенные из полученного эмульсионного экстракта.

2.4 Фракционирование нейтральных компонентов эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы

Омыление нейтральных компонентов

Омыление Н.К., полученных эмульсионным методом в лабораторном экстракторе, проводили раствором объемом 10,5 мл из бензола, этанола и 15 %-го раствора гидроксида калия (3:15:2). В круглодонную колбу объемом 250 мл поместили навеску Н.К. сосны массой 13,6 г и залили ее приготовленной смесью. Реакцию вели на магнитной мешалке с нагреванием и обратным холодильником, перемешивали в течение трех часов после закипания. Контроль за ходом реакции вели методом ТСХ, элюент петролейный эфир:диэтиловый эфир (3:1).

Реакционную смесь после охлаждения разбавили водой и перенесли в делительную воронку, далее экстрагировали петролейным эфиром (40-70 °С). Затем промыли петролейно-эфирный экстракт дистиллированной водой до нейтральной реакции, сушили над безводным сульфатом натрия и растворитель отогнали насухо на ротационном испарителе. Получили сумму неомыляемых веществ.

Водный раствор подкислили до $\text{pH}=2-3$ и экстрагировали диэтиловым эфиром. Экстракт диэтилового эфира промыли водой до нейтральной реакции, сушили над безводным сульфатом натрия и растворитель отогнали насухо на ротационном испарителе. Получили концентрат омыляемых веществ.

Хроматографическое разделение суммы неомыляемых веществ ДЗ сосны и лиственницы

3,0 г суммы неомыляемых Н.К. разделили методом колоночной хроматографии, колонка 100,0×2,0 см. В качестве элюента использовали смесь петролейный эфир:диэтиловый эфир при увеличении доли диэтилового эфира до 100 %. В результате выделили следующие соединения:

Изоабиенол (35), бесцветные кристаллы. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , м.д.): 5,31 (с, 2H, C-15), 5,04 (с, 2H, C-16), 2,0 (с, 2H, C-11), 1,17 (с, 3H, C-17), 0,91 (с, 3H, C-18), 0,82 (с, 3H, C-19).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 147,48 (C-13), 138,82 (C-14), 115,56 (C-16), 113,49 (C-15), 74,22 (C-8), 61,82 (C-9), 56,18 (C-5), 44,63 (C-7), 42,02 (C-3), 39,15 (C-4), 35,13 (C-12), 24,05 (C-17), 21,51 (C-20), 15,48 (C-18).

Эпиманоол (36). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , м.д.): 0,71 (с, 3H, C-20), 0,83 (с, 3H, C-19), 0,90 (с, 3H, C-18), 1,3 (с, 3H, C-16), 4,55 (с, 1H, C-17), 4,85 (с, 1H, C-17), 5,05 (дд, 1H, C-15), 5,20 (дд, 1H, C-15), 5,93 (дд, 1H, C-14).

^{13}C ЯМР (75 МГц, м.д., CDCl_3): 14,46 (C-20), 17,73 (C-11), 18,62 (C-2), 21,7 (C-19), 24,46 (C-6), 27,67 (C-16), 33,59 (C-1), 33,59 (C-18), 38,38 (C-1), 39,8 (C-10), 41,47 (C-12), 42,23 (C-3), 55,61 (C-5), 57,36 (C-9), 73,57 (C-13), 106,49 (C-17), 111,53 (C-15), 145,34 (C-14), 148,68 (C-8).

Эпиторулозол (37). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , м.д.): 0,72 (с, 3H, C-20), 0,85 (с, 3H, C-19), 1,0 (с, 3H, C-18), 1,27 (с, 3H, C-16), 4,54 (с, 1H, C-17), 4,82 (с, 1H, C-17), 5,06 (д, 1H, C-15), 5,22 (д, 1H, C-15), 5,92 (дд, 1H, C-14).

^{13}C ЯМР (75 МГц, м.д.): 148,14 (C-8), 145,29 (C-14), 111,56 (C-15), 106,77 (C-17), 73,51 (C-13), 64,98 (C-19), 57,42 (C-9), 56,37 (C-5), 41,37 (C-7), 39,02 (C-12), 38,64 (C-1), 35,47 (C-4), 27,64 (C-16), 27,11 (C-6), 21,09 (C-18), 19,00 (C-2), 17,84 (C-11), 15,25 (C-21).

Дегидроабиетинол (38). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , м.д.): 7,22 (д, 1H, C-11), 7,02 (д, 1H, C-12), 6,91 (с, 1H, C-14), 3,25 (д, 1H, C-19), 3,50 (д, 1H, C-19), 2,9 (с, 2H, C-7), 2,82 (с, 3H, C-16), 1,26 (с, 3H, C-17), 1,24 (с, 3H, C-20).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 147,34 (C-9), 145,52 (C-13), 134,76 (C-8), 126,80 (C-14), 124,22 (C-11), 123,35 (C-12), 72,23 (C-19), 46,72 (C-5), 38,46 (C-1), 37,84 (C-4), 37,34 (C-10), 35,13 (C-3), 33,45 (C-15), 29,70 (C-7), 17,40 (C-20).

Полипренолы (39), масло светло-желтого цвета. ИК-спектр (KBr , cm^{-1}): 3431 ($\nu\text{O-H}$), 2958 cm^{-1} до 2864 cm^{-1} C-H связи в группах CH_3 и CH_2 , 1672 и 1664 ($\nu\text{C=C}$), 1448, 1381, 987 ($\nu\text{C-O}$), 835 ($\delta\text{C=C-H}$).

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , м.д.): 1,58 (с, CH_3 *trans*), 1,63 (с, CH_3 , *cis*), 1,71 (с, $\alpha\text{-CH}_3$), 1,82 (м, $-\text{CH}_2-$), 4,12 (д, $-\text{CH}_2\text{OH}-$), 5,19 (м, $-\text{C}=\text{CH}-$), 5,5 (т, $-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{OH}$).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 15,94 (CH_3 , *trans*), 17,66 ($\omega\text{-CH}_3$, *trans*), 23,42 (CH_3 , *cis*), 25,68 ($\omega\text{-CH}_3$, *cis*), 26,70 ($-\text{CH}_2-$), 32,00 ($-\text{CH}_2-$, *trans-cis*), 32,22 ($-\text{CH}_2-$, *cis-cis*), 39,65 ($-\text{CH}_2-$, *trans-trans*), 59,03 ($-\text{CH}_2\text{OH}$), 124,90 ($-\text{C}=\text{CH}-$), 135,21 ($-\text{C}=\text{CH}-$).

β -ситостерин (40), белый порошок. ИК-спектр (KBr , cm^{-1}): 3464, 1630, 1470, 1382, 1060, 964, 844, 804.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , м.д.): 0,71 (с, 3H, C-18), 0,83 (с, 3H, C-26), 0,85 (с, 3H, C-27), 0,87 (т, 3H, C-29), 0,94 (с, 3H, C-21), 1,04 (с, 3H, C-19), 3,55 (м, 1H, C-3), 5,35 (тр, 1H, C-6).

^{13}C ЯМР (75 МГц, м.д.): 11,86 (C-18), 11,99 (C-29), 18,79 (C-26), 19,06 (C-21), 19,39 (C-19), 19,81 (C-27), 21,10 (C-11), 23,10 (C-28), 24,31 (C-15), 26,14 (C-23), 28,25 (C-16), 29,20 (C-25), 31,67 (C-2), 31,94 (C-8), 33,98 (C-22), 36,15 (C-20), 36,52 (C-10), 37,28 (C-1), 39,80 (C-12), 42,31 (C-4), 45,87 (C-24), 50,17 (C-9), 56,10 (C-17), 56,79 (C-14), 71,80 (C-3), 121,70 (C-6), 140,78 (C-7).

***n*-цимол (41)** (0,06 %) – бесцветное масло. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , м.д.): 7,10 (д, 1H, C-1, C-5), 6,85 (д, 1H, C-2, C-4), 6,68 (с, 3H, C-7).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 129,44 (C-1, C-5), 122,36 (C-2, C-4), 40,11 (C-8), 33,29 (C-9, C-10), 31,21 (C-7).

***n*-цимен-8-ол (42)**, бесцветное масло. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , м.д.): 7,08 (д, 1H, C-6, C-2), 6,91 (д, 1H, C-3, C-5), 4,06 (с, 1H (-OH)), 2,57 (с, 3H, C-7), 1,52 (с, 3H, C-9, C-10).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 153,91 (C-8), 130,94 (C-4), 129,40 (C-2, C-6), 121,67 (C-1), 115,3 (C-3, C-5), 67,65 (C-10), 55,85 (C-9), 23,52 (C-7).

Изопимариналь (43), бесцветные кристаллы. ^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д.): 206,5 (C-19), 148,02 (C-15), 120,10 (C-7), 110,25 (C-16), 55,63 (C-9), 44,16 (C-4), 43,29 (C-5), 38,87 (C-1), 37,88 (C-10), 35,69 (C-3), 34,30 (C-12), 29,71 (C-2), 25,13 (C-11), 21,23 (C-17), 19,94 (C-6), 18,57 (C-20), 17,48 (C-18)

^1H ЯМР (300 MHz, CDCl_3 , м.д.): 5,89 (с, 1H, C-15), 5,43 (с, 1H, C-7), 4,97 (с, 2H, C-16), 3,8 (т, 2H, C-6), 2,08 (с, 2H, C-3), 2,0 (с, 2H, C-14), 1,71 (с, 2H, C-2), 1,63 (с, 2H, C-11), 1,29 (с, 3H, C-20), 1,05 (с, 3H, C-18), 0,89 (с, 3H, C-17)

2.5 Фракционирование кислых компонентов эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы

Разделение кислых компонентов на «сильные» и «слабые» кислоты

16,5 г К.К. растворили в 300 мл диэтилового эфира, перенесли в делительную воронку и энергично встряхивали с насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (3×50 мл), при этом «сильные» кислоты связываются в натриевые соли. Водный слой отделили, промыли его диэтиловым эфиром (3×50 мл). Объединенные эфирные экстракты промыли водой до нейтральной реакции, сушили над безводным Na_2SO_4 , упарили досуха и получили сумму «сильных» кислот.

Оставшийся после отделения «сильных» кислот эфирный раствор, объединенный с промывным эфиром, встряхивали с 1 %-ым водным раствором гидроксида натрия (3×50 мл). При этом «слабые» кислоты связываются в натриевые соли. Водно-щелочной слой отделили, промыли его диэтиловым эфиром (3×50 мл) для удаления следов Н.К., подкислили до $\text{pH}=2$ раствором 12 %-ой серной кислоты и экстрагировали диэтиловым эфиром (3×50 мл). Объединенные эфирные экстракты промыли H_2O до нейтральной реакции. Сушили над безводным Na_2SO_4 , упарили досуха и получили сумму «слабых» кислот.

Получение метиловых эфиров «слабых» кислот

4,41 г смеси "слабых" кислот кипятили 5 мин в 120 мл метанола в присутствии серной кислоты, после охлаждения разбавляли водой (100 мл) и добавляли 300 мл 2 %-го водного раствора гидроксида натрия. Полученные метиловые эфиры кислот извлекали диэтиловым эфиром (три раза по 100 мл).

Затем промыли эфирный раствор водой до нейтральной реакции, высушили над безводным Na_2SO_4 , диэтиловый эфир отгоняли на ротаторном испарителе.

Хроматографическое разделение суммы «сильных» кислот

3,68 г суммы «сильных» кислот разделили методом колоночной хроматографии, колонка 125,0×2,5 см, силикагель L 70/230. В качестве элюента использовали смесь хлороформ:метанол при увеличении доли метанола до 100 %. В результате проведенной работы были выделены следующие соединения:

Пинифоловая (13S-лабд-8(17)-ен-15,18-диовая) кислота (44). ИК – спектр (KBr, cm^{-1}): 3078 ($=\text{CH}_2$), 2931 (CH_3), 2868 (CH_2), 1701 ($\text{C}=\text{O}$), 1645 ($\text{C}=\text{C}$).

^1H ЯМР (300 MHz, CDCl_3 , м.д.): 4,856 (с, 1H, C-17), 4,536 (с, 1H, C-17), 1,180 (с, 3H, C-19), 0,98 (т, 3H, C-16), 0,741 (с, 3H, C-20).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д, J/Гц): 185,51 (C-18), 179,76 (C-15), 147,89 (C-8), 107,02 (C-17), 57,13 (C-9), 49,53 (C-5), 47,57 (C-4), 41,35 (C-14), 38,98 (C-10), 38,01 (C-1), 37,85 (C-7), 37,10 (C-3), 35,73 (C-12), 30,89 (C-13), 26,83 (C-6), 20,84 (C-11), 19,94 (C-16), 18,44 (C-2), 16,30 (C-19), 14,69 (C-20).

Монометилловый эфир пинифоловой кислоты (45). ИК – спектр (KBr, cm^{-1}): 3080 ($=\text{CH}_2$), 2931 (CH_3), 2868 (CH_2), 1726 (COOCH_3), 1707 ($\text{C}=\text{O}$), 1645 ($\text{C}=\text{C}$).

^1H ЯМР (300 MHz, CDCl_3 , м.д.): 4,839 (с, 1H, C-17), 4,519 (с, 1H, C-17), 3,688 (с, 3H, C-21), 1,01 (т, 3H, C-16), 1,167 (с, 3H, C-19), 0,725 (с, 3H, C-20).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д, J/Гц): 179,36 (C-15), 178,94 (C-18), 147,96 (C-8), 106,92 (C-17), 57,12 (C-9), 51,89 (C-5), 49,91 (C-21), 47,80 (C-4), 41,29 (C-14), 39,09 (C-10), 38,06 (C-1), 37,87 (C-7), 37,04 (C-3), 35,74 (C-12), 30,89 (C-13), 26,85 (C-6), 20,82 (C-11), 19,92 (C-16), 18,48 (C-2), 16,59 (C-19), 14,71 (C-20).

Метилловый эфир имбрикатоловой ((13S)-15-гидроксилабд-8(17)-ен-19-овой) кислоты (46). ^1H ЯМР (300 MHz, CDCl_3 , м.д.): 4,84 (с, 1H, C-17), 4,52 (с, 1H, C-17), 3,69 (с, 3H, C-21), 2,38 (с, 2H, C-12), 1,0 (т, 3H, C-16), 1,17 (с, 3H, C-19), 0,73 (с, 3H, C-20).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д, J/Гц): 179,37 (C-18), 147,97 (C-8), 106,92 (C-17), 57,11 (C-5), 51,91 (C-9), 51,90 (C-21), 49,91 (C-14), 41,29 (C-4), 39,08 (C-10), 38,01 (C-1),

37,87 (C-3), 37,03 (C-7), 35,74 (C-12), 30,89 (C-13), 30,88 (C-19), 26,84 (C-6), 20,81 (C-11), 19,93 (C-16), 18,48 (C-2), 14,72 (C-20).

Изопимаровая кислота (47). ^1H ЯМР (300 MHz, CDCl_3 , м.д.): 5,82 (с, 1H, C-15), 5,40 (с, 1H, C-7), 4,98 (с, 1H, C-16), 4,97 (с, 2H, C-16), 2,25 (т, 2H, C-6), 2,10 (с, 2H, C-3), 1,95 (с, 2H, C-14), 1,71 (с, 2H, C-2), 1,61 (с, 2H, C-11), 1,28 (с, 3H, C-20), 1,04 (с, 3H, C-18), 0,86 (с, 3H, C-17).

^{13}C ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д, J/Гц): 150,32 (C-15), 145,27 (C-8), 21,50 (C-17), 51,44 (C-9), 44,91 (C-5), 46,33 (C-4), 38,29 (C-1), 122,40 (C-7), 37,00 (C-3), 34,47 (C-12), 109,27 (C-16), 25,62 (C-2), 18,06 (C-20), 16,72 (C-18).

***n*-кумаровая кислота (48).** ^1H ЯМР (300 MHz, CDCl_3 , м.д.): 7,65 (д, 1H, J=6,5, C-5), 7,65 (д, 1H, J=6,5, C-3), 6,85 (д, 1H, J=6,5, C-2), 6,85 (д, 1H, J=6,5, C-6), 6,33 (д, 1H, C-8).

^{13}C ЯМР (75 MHz, м.д.): 169,62 (-COOH), 159,74 (C-1), 145,28 (C-8), 130,90 (C-3, C-5), 125,86 (C-4), 115,44 (C-2, C-6), 117,23 (C-7).

Феруловая кислота (49). ^1H ЯМР (300 MHz, CDCl_3 , м.д.): 7,76 (д, 1H, J=6,5, C-3), 7,76 (д, 1H, J=6,5, C-6), 6,34 (д, 1H, J=6,5, C-8), 6,85 (д, 1H, C-7), 3,96 (с, -O-CH₃).

^{13}C ЯМР (75 MHz, м.д.): 179,97 (-COOH), 148,46 (C-1), 147,21 (C-2), 146,87 (C-7), 126,21 (C-4), 124,93 (C-5), 114,50 (C-3, C-6), 56,13 (-O-CH₃).

***n*-гидроксibenзойная кислота (50).** ИК – спектр (KBr, cm^{-1}): 3260 (-OH), 1683 (C-OH), 1602 (C=C), 1514 (C=C), 1460 (C=C).

^1H ЯМР (CDCl_3 , δ , м.д, J/Гц): 7,9 (д, 1H, J=6,5, C-5), 7,9 (д, 1H, J=6,5, C-3), 6,85 (д, 1H, J=6,5, C-2), 6,85 (д, 1H, J=6,5, C-6), 6,33 (д, 3H, C-8).

^{13}C ЯМР (300 MHz, CDCl_3 , м.д.): 169,62 (-COOH), 159,74 (C-1), 130,90 (C-3, C-5), 125,86 (C-4), 115,44 (C-2, C-6).

2.6 Исследование биологической активности эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы

Исследование биологической активности эмульсионного экстракта ДЗ сосны проводили в опытах трехкратной повторности по проращиванию семян овса

методом водно-бумажной культуры. Семена овса проращивали в течение пяти дней в бумажных рулонах, помещенных в стеклянные цилиндры с дистиллированной водой. В качестве среды для проращивания семян взяты полоски фильтровальной бумаги, сложенной вдвое. Длина полоски 51 см, ширина 15 см. Вдоль полоски, посередине, простым карандашом была проведена линия. Полоска фильтровальной бумаги была смочена водой комнатной температуры. По линии, проведенной на полоске, раскладывали семена зародышем кверху. На каждой полоске высеяна одна проба семян по 50 штук. Перед закладкой опыта семена выдерживали в дистиллированной воде до набухания, затем в эмульсионном экстракте сосны с различным содержанием дистиллированной воды в экстракте в течение 24 часов. Контроль - семена овса, выдержанные только в дистиллированной воде.

После этого, полоску фильтровальной бумаги вместе с высеянными семенами сворачивали в трубку, которую помещали стоя в стеклянный сосуд (цилиндр). Для поддержания фильтровальной бумаги во влажном состоянии в сосуд наливали дистиллированную воду (семена не должны доставать воду) и покрывали сверху чашкой Петри. Опыты проводили при комнатной температуре ~21 °С.

По окончании проращивания рулоны с семенами вынимали из сосуда, разворачивали и подсчитывали число проросших семян, а также была измерена длина проросших листьев и корней.

Исследования биологической активности фракции нейтральных и кислых компонентов эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы.

Работа была проведена в институте биологии Коми НЦ УрО РАН. Образцами для исследования являлись:

1. – нейтральные компоненты эмульсионного экстракта ДЗ сосны,
2. – кислые компоненты эмульсионного экстракта ДЗ сосны,
3. – нейтральные компоненты эмульсионного экстракта ДЗ лиственницы,
4. – кислые компоненты эмульсионного экстракта ДЗ лиственницы.

Анализ антирадикальной активности

Антирадикальную активность (АРА) образцов оценивали по их способности взаимодействовать со стабильным хромоген-радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ). Образцы вносили в метанольный раствор ДФПГ в концентрациях 0,05 и 0,5 мг/мл, перемешивали, через 30 мин измеряли оптическую плотность раствора при $\lambda=517$ нм с использованием спектрофотометра Thermo Spectromic Genesys 20 (США). Степень ингибирования рассчитывали в процентах по отношению к оптической плотности раствора ДФПГ, не содержащего исследуемых соединений [136].

Анализ антиоксидантной активности

Антиоксидантную активность образцов оценивали (*in vitro*) по способности ингибировать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в липидах головного мозга лабораторных мышей [137]. После извлечения головного мозга гомогенизировали (10%) в физиологическом растворе (рН=7.4) и центрифугировали в течение 10 мин, затем отбирали супернатант (S1), содержащий липиды. Исследуемые образцы вносили в супернатант в виде ацетоновых растворов (конечная концентрация 0,05 и 0,5 мг/мл). Через 30 мин инициировали ПОЛ внесением свежеприготовленного FeCl_2 и аскорбиновой кислоты. Исследуемые образцы инкубировали в течение часа при 37 °С и медленном перемешивании. Содержание вторичных продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП), определяли с использованием спектрофотометра Thermo Spectromic Genesys 20 (США) при $\lambda=532$ нм, для расчетов использовали коэффициент экстинкции $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [138, 139].

Анализ гемолитической активности

Для оценки гемолитической активности, антиоксидантной и мембранопротекторной активности образцов использовали 0,5 % (v/v) суспензию эритроцитов лабораторных мышей в фосфатно-солевом буфере (PBS, рН 7.4).

Гемолитическую активность оценивали по степени гемолиза эритроцитов через 1-5 ч после внесения растворов исследуемых фракций. Мембранопротекторную и антиоксидантную активность определяли по степени ингибирования H_2O_2 -индуцированного гемолиза, торможения накопления вторичных продуктов ПОЛ и окисления оксигемоглобина в эритроцитах. С этой целью спустя 30 мин после внесения в суспензию эритроцитов растворов исследуемых образцов (итоговая концентрация 0,05 и 0,005 мг/мл) инициировали гемолиз раствором пероксида водорода (0,006 %). Затем реакционную смесь инкубировали в термостатируемом шейкере при медленном перемешивании и 37 °С в течение 5 ч. Каждый час из инкубационной среды отбирали аликвоту, центрифугировали 5 мин (1600 g), степень гемолиза определяли по содержанию гемоглобина в супернатанте на спектрофотометре Thermo Spectromic Genesys 20 (США) при λ 524 нм [140]. Процент гемолиза рассчитывали по отношению к полному гемолизу образца. Содержание вторичных продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобрабитуровой кислотой (ТБК-АП), определяли спектрофотометрически как указано выше. Для оценки накопления продуктов окисления гемоглобина анализировали спектр поглощения в интервале длин волн 540–640 нм. Содержание различных форм гемоглобина (oxyHb, metHb и ferrylHb) рассчитывали с учетом соответствующих коэффициентов экстинкции [141].

Каждый эксперимент проводили в 4-8 повторностях. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакетов программ Microsoft Office Excel 2007, а также Statistica 6.0. Экспериментальные данные представлены в виде среднеарифметических значений с указанием стандартной ошибки выборки (SEM).

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Выделение экстрактивных веществ из ДЗ сосны в лабораторном экстракторе

Принцип «зеленых» технологий основан на открытиях и разработках экстракционных процессов, способных использовать безопасные альтернативные виды растворителей и обеспечивать получение высококачественного продукта/экстракта [142]. Эмульсионный метод экстракции, разработанный в Институте химии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, заключается в обработке измельченного растительного сырья водным раствором основания. Применяемый для эмульсионной экстракции экстрагент – водно-щелочной раствор отличается своей доступностью, высокой эффективностью и обладает важными для сохранения окружающей среды свойствами – не содержит токсичных примесей.

В процессе обработки липидная часть переходит в водную среду вместе с водорастворимыми компонентами. Этот эффект достигается за счет эмульсионных систем, которые создаются в процессе извлечения из сырья поверхностно-активных веществ (солей смоляных и жирных кислот, фосфолипидов, глицеридов и т.д.) при действии щелочного раствора.

Эффективность процесса эмульсионной экстракции зависит от основных технологических факторов: концентрации щелочного раствора, степени измельчения сырья, соотношения объема щелочного раствора к массе сырья (гидромодуля), температуры и продолжительности экстракции. Данные параметры влияют на физико-химические характеристики эмульсионной смеси и, как следствие на степень извлечения ЭВ. Для каждого вида растительного сырья необходимо экспериментально подбирать условия проведения экстракции.

Ранее были проведены исследования закономерностей эмульсионного выделения низкомолекулярных компонентов из ДЗ пихты и ели [143-145].

В данном исследовании комплексную оценку влияния технологических параметров эмульсионной экстракции ДЗ сосны на выход ЭВ проводили с

применением метода математического планирования многофакторного эксперимента с построением ротатабельного композиционного униформ – плана второго порядка для двух факторов [146]. Опыты проводили в лабораторном экстракторе объемом 1 л с механическим перемешиванием (1000 об/мин).

Выход ЭВ (% от массы сухого сырья) рассматривался как параметр оптимизации, а независимыми переменными были концентрация NaOH (%) (X_1) и ГМ (X_2). Выход ЭВ определяли, суммируя выходы кислых и нейтральных компонентов, выделенных из полученных эмульсионных экстрактов, кислотно-основным методом. Значения изучаемых факторов представлены в таблице 4. Для обеспечения ортогональности плана были добавлены звездные (дополнительные) точки. Величина звездного плеча α для ротатабельного плана второго порядка зависит от факторного пространства, то есть количества независимых переменных, влияющих на процесс. Так, табличное значение звездного плеча α в плане для двух факторов равно 1,414 [146].

Таблица 4 - Уровни и интервалы варьирования факторов

Фактор	Характеристики плана				
	Уровни факторов				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
Концентрация водного раствора NaOH, %, X_1	3,6	4	5	6	6,4
ГМ, X_2	7:1	8:1	10:1	12:1	13:1

Исследование включало 13 экспериментальных опытов в трех повторностях со всеми возможными комбинациями уровней двух изучаемых факторов. Чтобы исключить влияние систематических ошибок, вызванных внешними условиями, порядок экспериментов был полностью рандомизирован. Условия планированного эксперимента в кодированном виде и результаты реализации матрицы приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Матрица планирования эксперимента в кодированном виде и результаты ее реализации

№ опыта	X ₁	X ₂	Выход ЭВ (Y), % от массы сухого сырья	
			Y _{экспер}	Y _{расч}
1	-1	-1	3,10	4,34
2	1	-1	6,05	5,61
3	-1	1	5,96	6,77
4	1	1	6,36	5,49
5	-1,414	0	7,33	6,50
6	1,414	0	6,02	6,50
7	0	-1,414	4,26	3,79
8	0	1,414	5,29	5,42
9	0	0	9,06	9,84
10	0	0	9,72	9,84
11	0	0	10,40	9,84
12	0	0	10,04	9,84
13	0	0	9,98	9,84

Примечание. Опыты с 1 по 4 основные; с 5 по 8 – звездные точки; с 9 по 13 – центр плана («0»).

Был проведен регрессионный анализ полученных экспериментальных данных, в результате чего получены коэффициенты и уравнение регрессии в кодированных значениях:

$$Y = 9,84 + 0,19 X_1 + 0,58 X_2 - 1,67 X_1^2 - 0,64 X_1 X_2 - 2,62 X_2^2 \quad (1)$$

На следующем этапе оценивалась значимость полученных коэффициентов по критерию Стьюдента. Для этого были определены доверительные интервалы для дисперсий групп коэффициентов ($\delta_i=0,49$, $\delta_{ij}=0,69$, $\delta_{ii}=0,53$) при критическом распределении Стьюдента ($t_{кр}$) для уровня значимости $\alpha=0,05$ и числе степеней свободы $f_2=4$, равном 2,77 и проведено сравнение полученных значений со значениями коэффициентов уравнения регрессии (1).

Все коэффициенты в уравнении регрессии (1), превышающие доверительные интервалы для дисперсий групп коэффициентов, являются значимыми. Соответственно, коэффициенты: $\beta_1 (0,19) < \delta_i (0,49)$ и $\beta_{12} (0,64) < \delta_{ij} (0,69)$ являются незначимыми и их следует исключить из уравнения, остальные же коэффициенты β_2 , β_{11} и β_{22} являются значимыми и мы оставляем их для оценки адекватности полученной модели.

В результате, после исключения из уравнения эффектов с незначимыми коэффициентами получено уравнение (2), используемое нами для оценки адекватности модели:

$$Y = 9,84 - 1,67X_1^2 - 2,62X_2^2 \quad (2)$$

Для проверки адекватности модели проведено сравнение рассчитанного критерия Фишера с табличным значением. Рассчитанное значение критерия Фишера $F=4,75$ для полученного уравнения (2) не превосходит табличного $F_{кр}=6,26$ для уровня значимости $\alpha=0,05$ (95%) и числа степеней свободы $f_1=5$, $f_2=4$. Таким образом, можно считать, что полученное эмпирическое уравнение верно описывает опытные данные.

Однако, можно предположить, что некоторые из коэффициентов уравнения, не являясь значимыми, правильно прогнозируют изменения в факторном пространстве в условиях опытов. Незначимое их влияние не всегда свидетельствует о том, что тот или иной параметр в уравнении искажает информацию, а значит, необходимо эту информацию исключать из анализа. Во многих случаях незначительное влияние коэффициента на прогнозирующую способность модели объясняется слабой, но по существу верной его информативностью [146]. Для проверки высказанного предположения нами в уравнение был введен коэффициент β_{12} , как самый больший из незначимых коэффициентов по абсолютному значению. В результате повторного расчета, значение расчетного критерия Фишера уменьшилось с 4,75 до 4,2. Таким образом, делаем вывод о необходимости оставить произвольно введенного в модель коэффициента β_{12} и использовать новое уравнение регрессии (3) для анализа поверхности отклика.

$$Y = 9,84 - 1,67X_1^2 - 0,64X_1X_2 - 2,62X_2^2 \quad (3)$$

По полученному уравнению регрессии (3) были рассчитаны теоретические значения выхода ЭВ. Сравнивая расчетное ($Y_{\text{расч}}$) и опытное ($Y_{\text{экспер}}$) значения выходного параметра в каждой точке, можем оценить адекватность всей модели. Расчетные значения ($Y_{\text{расч}}$) (таблица 2) находим, подставляя соответствующие кодированные значения X_i в уравнение (3). В результате расчетные значения выходов ЭВ близки к экспериментально полученным данным и не превышают рассчитанной ошибки опытов $SE=0,996$, что свидетельствует об адекватности модели

Для наглядности, на основе полученного уравнения регрессии (3) построен трехмерный график поверхности отклика (рисунок 2), графически изображающий зависимость между выходом ЭВ и двумя независимыми переменными.

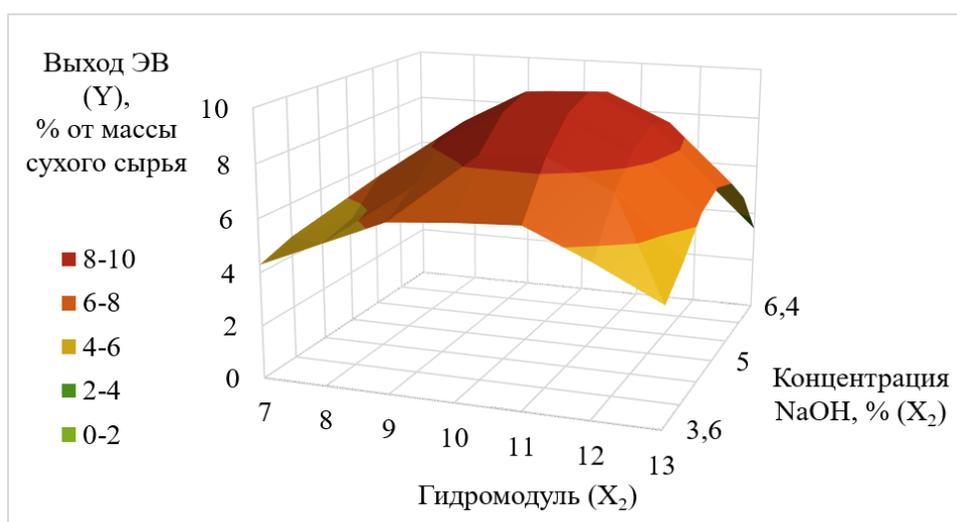


Рисунок 2 - Зависимость выхода ЭВ от концентрации NaOH и гидромодуля

Известно, что если коэффициент имеет положительный знак, то с увеличением значения фактора параметр оптимизации увеличивается, а если отрицательный, то уменьшается. Соответственно, при увеличении ГМ выход ЭВ увеличивается. Согласно экспериментальным данным значение выхода ЭВ растет при увеличении ГМ до 10:1. Далее устанавливается равновесная концентрация в

системе «сырье – экстрагент», что подтверждается литературными данными [147]. При увеличении объема экстрагента все больше ЭВ переходит из растительной ткани в растворитель, но до определенного предела, которым является момент, когда все легко связанные вещества клетки перешли в раствор, и остаются только прочно связанные и трудно доступные растворителю [148]. Помимо этого, концентрация раствора NaOH ниже 5% не обеспечивает эффективной экстракции из-за дефицита щелочи, необходимой для эмульгирования липофильных веществ, гидролиза сложных эфиров, а также нейтрализации кислот, содержащихся в ДЗ.

Значимые коэффициенты при квадратичных эффектах X_1^2 и X_2^2 в уравнении регрессии (3) свидетельствуют о наличии экстремальных значений функции в выбранном диапазоне переменных. Причем отрицательный знак коэффициента свидетельствует о наличии максимума на кривых, характеризующих изменение выхода ЭВ в зависимости от концентрации NaOH и ГМ, что подтверждается экстремумом функции на графике поверхности отклика (см. рисунок 2).

На основе результатов анализа регрессионного уравнения, а также в соответствии с характером поверхности отклика и рассмотрения влияния технологических параметров на процесс выделения ЭВ был определен следующий оптимальный режим в выбранном диапазоне переменных: концентрация водного раствора NaOH – 5 %, ГМ – 10:1. В оптимальном режиме был получен экстракт с выходом ЭВ 9,84 % от массы сухого сырья [149]. Для сравнения, методом исчерпывающей экстракции ДЗ сосны ацетоном в аппарате Сокслета нами выделены ЭВ с выходом 8,9 % от массы сухого сырья. По литературным данным, при экстракции ДЗ сосны гексаном выделяется до 14 % от массы сухого сырья ЭВ [150], диэтиловым эфиром 9,3 – 14,8 % [44, 47], ацетоном 9,9 % [151]. Таким образом, эффективность метода экстракции водно-щелочным раствором ДЗ сосны сопоставима с экстракцией сырья органическими растворителями. При этом, преимуществом нашего метода является то, что для выделения ЭВ из древесной зелени не используются пожароопасные и токсичные органические растворители.

3.2 Выделение экстрактивных веществ из ДЗ лиственницы в лабораторном экстракторе

Было проведено изучение закономерностей изменчивости содержания ЭВ в эмульсионных экстрактах частей кроны лиственницы в разные вегетационные периоды. ДЗ собирали в июле, августе и сентябре, а также отдельно пожелтевшую хвою и ветки, собранные в сентябре. Данный временной промежуток был выбран исходя из литературных данных [3].

Опыты по эмульсионной экстракции разных частей кроны лиственницы проводили при концентрации щелочного раствора 5 %, ГМ 10:1, продолжительности настаивания сырья в водном растворе щелочи 60 минут, перемешивании - 30 минут.

Исследования показали, что в летний период максимальное количество ЭВ 6,94 % содержится в ДЗ июльского сбора (таблица 6). При этом, по данным литературы [20], петролейным эфиром из ДЗ лиственницы выделяется 2,5 % ЭВ, диэтиловым эфиром – до 7 %, что также подтверждает эффективность метода эмульсионной экстракции. В осеннем же сырье суммарное содержание веществ значительно увеличивается, причем основная их масса накапливается в ветках. При этом, выход нейтральных веществ в пожелтевшей хвое в 10 раз меньше, чем в побегах. В осенний период в ветках происходит запас основной массы необходимых для жизнедеятельности дерева веществ, чтобы они не были утрачены при опадании хвои. Результаты свидетельствуют, что максимальное накопление ЭВ в ДЗ приходится на июль.

Таблица 6 – Выход экстрактивных веществ частей кроны лиственницы

Время сбора сырья	Выход ЭВ, % от массы сухого сырья		
	Н.К.	К.К.	Сумма
Июль (ДЗ)	0,98±0,02	5,96±0,08	6,94
Август (ДЗ)	0,66±0,06	5,42±0,04	6,08
Сентябрь (ДЗ)	0,56±0,08	4,38±0,06	4,94

Продолжение таблицы 6

Время сбора сырья	Выход ЭВ, % от массы сухого сырья		
	Н.К.	К.К.	Сумма
Сентябрь (хвоя)	0,14±0,09	4,34±0,08	4,48
Сентябрь (ветки)	1,48±0,05	8,26±0,07	9,74

3.3 Анализ фракционного состава нейтральных компонентов эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы

Полученные нейтральные компоненты из эмульсионного экстракта кислотно-основным методом (п. 2.3) омыляли спиртовой щелочью и разделяли на омыляемые и неомыляемые вещества. Из результатов исследования следует, что группа неомыляемых веществ является доминирующей в эмульсионных экстрактах исследуемых хвойных пород (таблица 7).

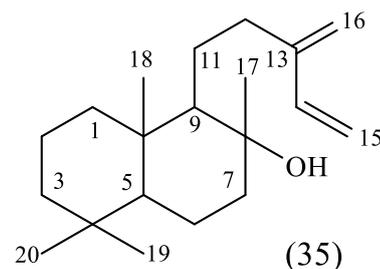
Таблица 7 – Групповой состав нейтральных компонентов эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы (% от суммы нейтральных веществ)

Группа веществ	Содержание	
	ДЗ сосны	ДЗ лиственницы
Неомыляемые	71,19	79,13
Омыляемые	26,36	14,84

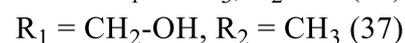
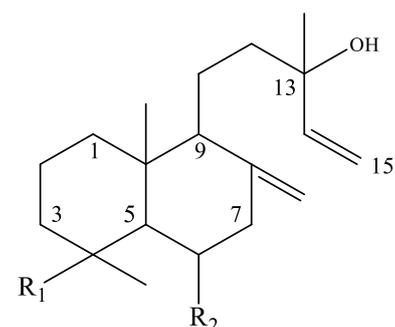
Группу неомыляемых веществ разделили методом колоночной хроматографии на фракции, различающихся по полярности соединений и исследовали методами ИК- и ЯМР-спектроскопии.

Наибольшее содержание в обоих экстрактах имела фракция дитерпеновых спиртов (28,6 % от суммы нейтральных компонентов экстракта сосны и 25,9 % лиственницы). В экстракте сосны преобладал изоабиенол (35) (0,53 % от массы сухого сырья). В ЯМР ^{13}C спектре наблюдаются сигналы атомов CH_2 при концевых

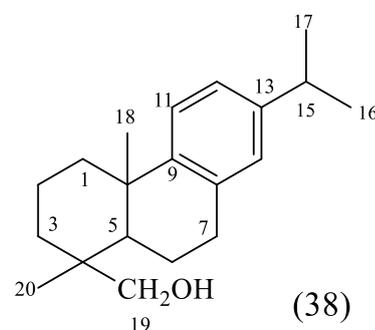
двойных связях в области 115,56 и 113,49 м.д., сигнал четвертичного атома С, связанного с ОН группой при 74,22 м.д. (приложение А). Соединение является характерным для *P. Sylvestris* и традиционно его извлекают бензином или петролейным эфиром из хвои сосны [32].



Из экстракта ДЗ лиственницы выделены соединения, характерные для рода *Larix* – эпиманоол (36) [152] (0,03 %) и эпиторулозол (37) [153] (0,03 % от массы сухого сырья). В спектре ЯМР C^{13} данных соединений сигналы концевых атомов углерода при двойных связях присутствуют в области 111,5 и 106,7 м.д., четвертичного атома С при двойной связи – в области 148,1 м.д. и сигнал третичного C^{14} в области 145,2 м.д. Наличие гидроксильных групп подтверждается сигналами, находящимися в области 73,5 и 64,9 м.д.

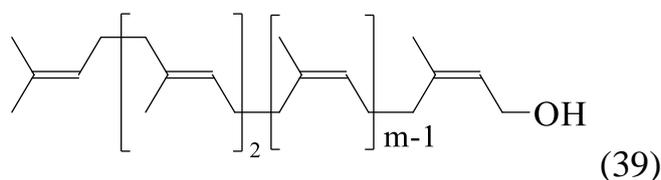


Из фракции трициклических дитерпеноидов выделен основной компонент – дегидроабетинол (38). В спектре ЯМР ^{13}C в области 72,23 м.д присутствуют сигналы атома углерода, связанного с ОН-группой, сигналы трех замещенных атомов углерода ароматического кольца при 134,76, 145,52, 147,34 м.д. и незамещенных атомов углерода ароматического кольца – при 123,35, 124,22, 126,80 м.д. [154]. В экстракте ДЗ сосны содержание данного соединения составило 0,14 % от массы сухого сырья, что в 2,5 раза выше, чем в экстракте лиственницы (0,06 %).

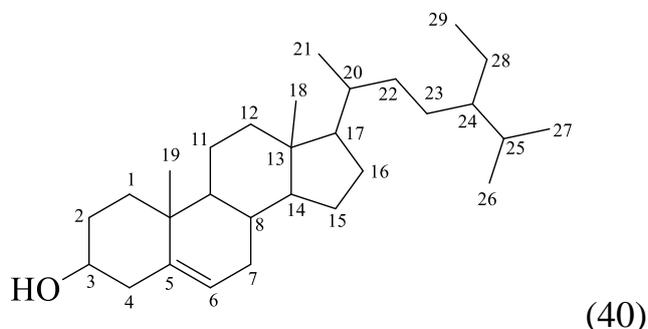


С высоким выходом (из ДЗ сосны 0,41 % от массы сухого сырья и 0,13 % из ДЗ лиственницы) выделена фракция полипренолов (39) [155-157]. Основными пренолами лиственницы являются соединения с 14-20 изопреновыми звеньями [158], полипренолы ДЗ сосны состоят из 10-19 изопреновых звеньев в цепи

молекулы [41-43]. В ИК спектре фракции наблюдаются полосы поглощения валентных колебаний ОН группы в области 3431 см^{-1} , связи С–О первичных спиртов в области $1448, 1381, 981\text{ см}^{-1}$, валентные колебания связи С=C при 1664 см^{-1} и колебания связи С–Н при 835 см^{-1} . В области 2958 см^{-1} до 2864 см^{-1} наблюдаются полосы поглощения, характерные валентным колебаниям С–Н связи в группах CH_3 и CH_2 . В спектре ЯМР ^{13}C наблюдается сигнал при $73,57$ м.д., соответствующий четвертичному атому углерода, связанного с ОН группой (приложение Б). В спектре ЯМР ^1H присутствуют сигналы при $1,63$ м.д. и $1,71$ м.д., относящиеся к протонам метильных групп изопреновых единиц. Сигнал $1,82$ м.д. относится к метильной группе α -цис изопреновой единицы. Из ДЗ сосны выход полипренолов составил $0,41\%$ от массы сухого сырья и $0,13\%$ из ДЗ лиственницы.

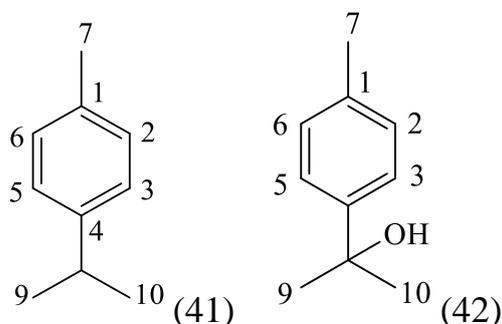


Фракция тетрациклических тритерпеновых спиртов в обоих исследуемых образцах представлена β -ситостерином (40). Наиболее высокое его содержание в ДЗ сосны - $0,14\%$ от массы сухого сырья, чем в экстракте ДЗ *Larix sibirica* – $0,08\%$. Наличие в спектре ^1H ЯМР мультиплета при $3,55$ м.д. характерного для протонов CH_2OH и триплета в области $5,35$ м.д. – для протонов $-\text{C}=\text{CH}-$ группы, а также наличие в спектре ЯМР ^{13}C при $71,80$ м.д. сигналов третичного атома углерода, связанного с ОН-группой и атомов $-\text{C}=\text{}$ и $-\text{CH}-$ в области $140,80$ и $121,70$ м.д. подтверждает структуру данного соединения [159, 160].

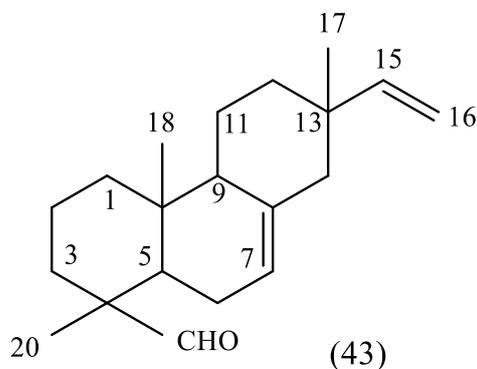


В состав нейтральных компонентов эмульсионного экстракта ДЗ сосны входят ароматические монотерпеноиды. Анализ спектральных ЯМР и ИК данных

позволил идентифицировать *n*-цимол (41) (0,06 %) и *n*-цимен-8-ол (42) (0,07 %) [161]. Ранее данные соединения были найдены в коре *Pinus sylvestris*, произрастающей в Турции [162]. В эмульсионном экстракте ДЗ лиственницы данные соединения не были найдены.



Фракция альдегидов составила наименьшую долю неомыляемых веществ обоих экстрактов, основной компонент – дитерпеновый альдегид изопимариналь (43). По данным спектра ЯМР ^{13}C сигналы в области 120,10 и 148,02 м.д. соответствуют третичному атому углерода при двойной связи, сигнал при 206,50 м.д. характерен для альдегидной группы [163]. Ранее изопимариналь был найден в древесине *P. sylvestris* и живице *P. Nigra* в следовых количествах [164, 165].



Таким образом, в составе нейтральных компонентов эмульсионного экстракта сосны преобладает дитерпеновый спирт изоабиенол [166], а в экстракте лиственницы – полипренолы.

3.4 Анализ фракционного состава кислых компонентов эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы

Согласно литературным данным, компоненты кислой части ЭВ ДЗ сосны и лиственницы представляют собой сложную смесь карбоновых кислот и фенольных

соединений [34]. Из полученной суммы К.К. эмульсионных экстрактов кислотно-основным методом были выделены «сильные» и «слабые» кислоты [167].

Выход «сильных» кислот составил 20,5 % от суммы кислых компонентов ДЗ сосны и 14,6 % ДЗ лиственницы, «слабых» – 26,7 % и 59,4 % соответственно.

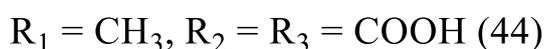
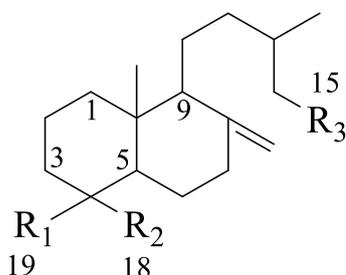
Состав «слабых» кислот был изучен методом ГЖХ их метиловых эфиров. Они представлены суммой жирных кислот. В ИК спектре фракции «слабых» кислот наблюдается полоса поглощения ν C=O при 1743 и 2924 см^{-1} (ν CH₂), слабые полосы валентных колебаний C=C при 3008 и 1653 см^{-1} , деформационных колебаний метиленовых групп при 1460, 1438 см^{-1} ; деформационных колебаний метильной группы 1363 см^{-1} .

В обоих экстрактах преобладала линоленовая кислота, ее выход составил 1,02 % от массы сухого сырья из экстракта сосны и 0,78 % из экстракта лиственницы. «Слабые» кислоты лиственницы отличались высоким содержанием пальмитиновой кислоты (0,66 %), выход которой в 2 раза выше, чем в экстракте сосны (0,34 %). Содержание линолевой кислоты в обоих образцах было практически одинаково и составляло около 0,45 %. Стоит отметить, что в сравнении с экстракцией органическими растворителями, методом эмульсионной экстракции выделяется большее количество жирных кислот. Ранее данные кислоты извлекались петролейным эфиром из изопропилового экстракта хвои лиственницы с выходами: пальмитиновая 0,38 %, линоленовая 0,54 % и линолевая 0,17 % [17].

Сумма «сильных» кислот была разделена методом колоночной хроматографии на фракции. По данным ИК-спектроскопии «сильные» кислоты содержат ароматические соединения, что подтверждается наличием полос валентных колебаний ароматического кольца в области 1602, 1514, 1460 см^{-1} , валентные колебания карбонильной группы, сопряженной с фенильным радикалом при 1705 см^{-1} .

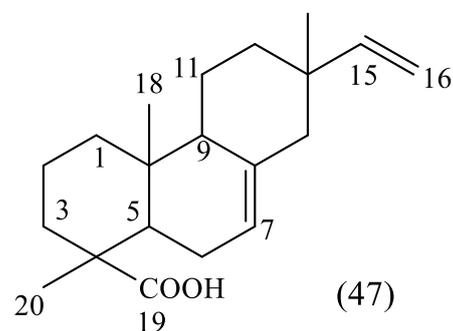
Основными компонентами суммы «сильных» кислот эмульсионного экстракта сосны являются дитерпеновые кислоты и эфиры. Среди которых доминируют пинифоловая кислота (44) (1,98 %), метиловый эфир пинифоловой кислоты (45) (1,91 %) и метиловый эфир имбрикатоловой кислоты (46) (1,78 %). В

ЯМР C^{13} спектре пинифоловой кислоты наблюдались сигналы карбоксильных групп в области 185 и 179 м.д. В ЯМР H^1 -спектре присутствуют сигналы атомов H при двойных связях в области 4,8 м.д., протонов метильных групп в области 1,1 м.д. (приложение В).



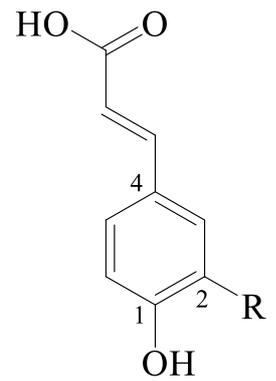
В спектре ЯМР C^{13} метилового эфира пинифоловой кислоты (1,91 %) наблюдается смещение сигнала атома C в область 178,94 м.д в сравнении со спектром соответствующей кислоты и появляется дополнительный пик метокси – группы метиловых эфиров кислот - в области 50 м.д. В спектре ЯМР H^1 появляется дополнительный синглет в области 3,68 м.д., что свидетельствует о замещении атома водорода в карбоксильной группе пинифоловой кислоты на метильную группу при C₁₈.

Во фракции дитерпеновых кислот эмульсионного экстракта лиственницы наибольшее содержание имела изопимаровая кислота (47) (0,64 %), что почти в 2 раза выше, чем в экстракте сосны (0,33 %). Среднее содержание данного компонента в экстрактах хвои лиственницы сибирской, полученных органическими растворителями составляет лишь 0,08 % от массы сухого сырья [17].



Кислые компоненты экстракта ДЗ лиственницы отличаются высоким содержанием фенолокислот (2,9 % от массы сухого сырья), их содержание в ДЗ сосны - 1,64 %. В ИК спектре наблюдаются валентные колебания $-C=C-$ связей

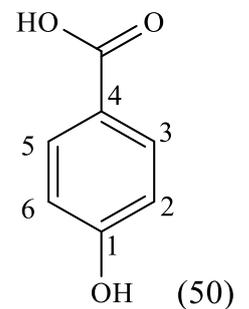
ароматического кольца в области 1602, 1514, 1460 см^{-1} , валентные колебания карбонильной группы, сопряженной с фенильным радикалом при 1683 см^{-1} и валентные колебания фенольных ОН-групп проявляются в виде интенсивной полосы в области 3260 см^{-1} . Мажорным компонентом в обоих образцах является *n*-кумаровая кислота (48) (1,26 % в ДЗ сосны и 1,09 % в ДЗ лиственницы) (приложение Г)



R = H (48)

R = O-CH₃ (49)

Также, из экстракта лиственницы выделена феруловая кислота (49) (0,24 %). Из экстракта сосны - *n*- гидроксibenзойная кислота (50) с выходом 0,38 %. Структура 1,4-замещенного бензольного кольца подтверждается углеродным спектром присутствием двух интенсивных сигналов при 130 и 115 м.д., принадлежащим двум парам эквивалентных атомов углерода бензольного кольца.



(50)

Для оценки эффективности метода эмульсионной экстракции, проведена экстракция низкомолекулярных соединений из ДЗ сосны ацетоном в аппарате Сокслета. Выход ЭВ составил 9,37 % от массы сухого сырья. Из полученного экстракта, после его концентрирования, выделяли К.К. (3,6% от массы сухого сырья) и далее делили методом колоночной хроматографии. В результате, выделены дитерпеновые кислоты и их эфиры с выходами: метиловый эфир пинифоловой кислоты (45) - 0,42 %, пинифоловая кислота (44) - 0,3 % и метиловый эфир имбрикатоловой кислоты (46) - 0,16 % от массы сухого сырья.

Таким образом, установлено, что эмульсионный метод позволяет эффективно выделять группу дитерпеноидов из древесной зелени сосны [168]. Степень извлечения пинифоловой кислоты выше по сравнению с экстракцией ацетоном в аппарате Сокслета в 6,6 раз.

Проведенные нами исследования подтверждают высокую эффективность метода эмульсионной экстракции. В результате из растительного сырья извлекается максимально вся сумма компонентов различной полярности. Тогда как

при традиционных методах экстракции применяют органические растворители различной полярности, в зависимости от целевых соединений.

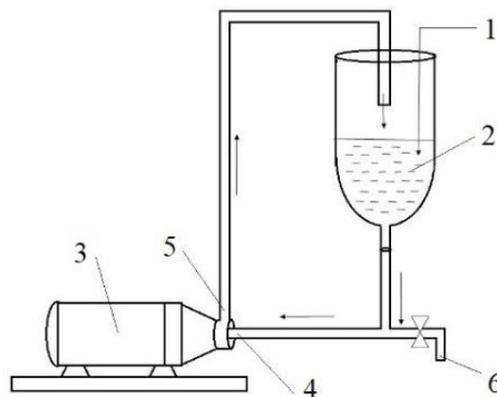
3.5 Эмульсионная экстракция низкомолекулярных соединений из растительного сырья в аппаратах роторно-пульсационного и гравитационного типа

Для наработки эмульсионных экстрактов и проведения исследований их биологической активности была изучена эффективность эмульсионной экстракции ДЗ в аппаратах роторно-пульсационном (РПА) и гравитационного типа (АГТ).

Выделение экстрактивных веществ из ДЗ сосны в РПА

Роторно-пульсационный аппарат (изготовитель ООО НПП «Авиатехника», г. Казань) имеет проточную рабочую камеру, в которой размещены двухрядные ротор и статор с каналами для прохода обрабатываемой суспензии. Вращение ротора осуществляется от трехфазного асинхронного двигателя [169].

Способ экстрагирования на установке с РПА (схема представлена на рисунке 3) основан на многократной циркуляции сырья и экстрагента по замкнутому контуру через РПА и стеклянную емкость объемом 10 л.



1 - сырье и экстрагент, 2 - стеклянная емкость, 3 - РПА с насосом, 4 - патрубок входа смеси в РПА, 5 - патрубок выхода смеси из РПА, 6 – патрубок выхода переработанной смеси из установки

Рисунок 3 – Схема установки с РПА

Принцип работы РПА: обрабатываемая смесь поступает через патрубок входа смеси (4) под давлением в полость ротора, затем проходит через каналы ротора и статора и выходит из аппарата через патрубок выхода смеси (5) [170].

Экстракцию ДЗ сосны на установке с РПА проводили при следующих параметрах: концентрация раствора NaOH 5 %, ГМ 15:1. Для исключения забивки сырьем зазора между статором и ротором проводили сушку и измельчение сырья до фракции от 0,5 до 3 мм. При обработке сырья в РПА в результате трения происходит разогрев смеси. Для подбора оптимальной продолжительности экстракции, опыты проводили в течение 15, 20 и 30 мин с контролем температуры каждые 5 мин. В результате многократной обработки сырья происходит образование трудноразделяемой смеси, в связи с чем для фильтрования использовали капроновый фильтр.

Влияние продолжительности экстракции на выход ЭВ представлено на рисунке 4.

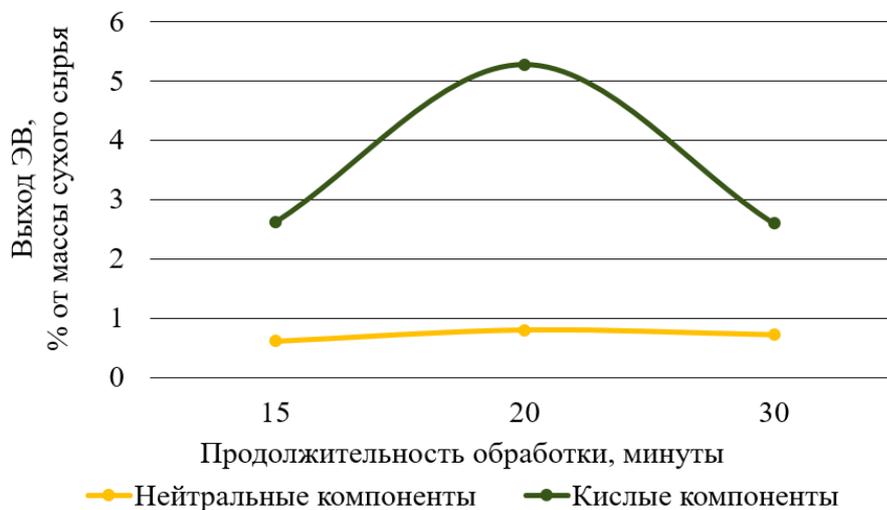


Рисунок 4 – Влияние продолжительности обработки ДЗ сосны в РПА на выход ЭВ

Установлено, что при обработке сырья в течение 30 минут и ГМ 15:1 происходит разогрев смеси выше 60 °С, вызванный спецификой работы аппарата.

Это ведет к снижению выхода ЭВ из-за разрушения эмульсии и потери летучих веществ. Максимальный выход ЭВ ($6,08 \pm 0,15$) % от массы сухого сырья достигается при экстракции сырья в РПА в течение 20 минут

Далее были проведены опыты по определению влияния ГМ на выход ЭВ. Процесс осуществляли при ГМ 10:1, 12:1 и 15:1, концентрации раствора NaOH 5 %, продолжительность экстракции 20 мин. На рисунке 5 показано влияние ГМ на выход ЭВ.

В результате, при уменьшении ГМ до 12:1 выход ЭВ увеличился в сравнении с ГМ 15:1 и составил ($6,65 \pm 0,05$) % от массы сухого сырья.

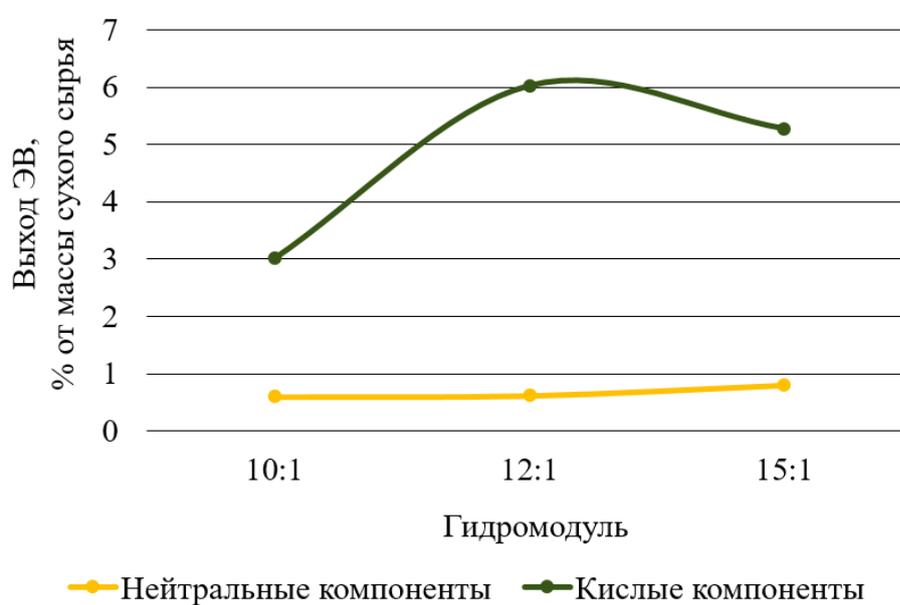


Рисунок 5 – Влияние ГМ на выход ЭВ ДЗ сосны

Таким образом, оптимальными условиями эффективного извлечения ЭВ из ДЗ сосны в РПА являются: концентрация NaOH 5 %, ГМ 12:1, продолжительность экстракции 20 мин.

Выделение экстрактивных веществ из ДЗ лиственницы в РПА

При эмульсионной экстракции ДЗ лиственницы (сбор июль) в РПА определяли влияние концентрации NaOH и гидро модуля на выход ЭВ (рисунок 6).

Концентрацию NaOH варьировали от 4 % до 7 %, ГМ от 10:1 до 14:1, продолжительность обработки было постоянным – 20 минут.

В результате, наиболее полное извлечение ЭВ достигается при концентрации NaOH 6 % и ГМ 14:1.

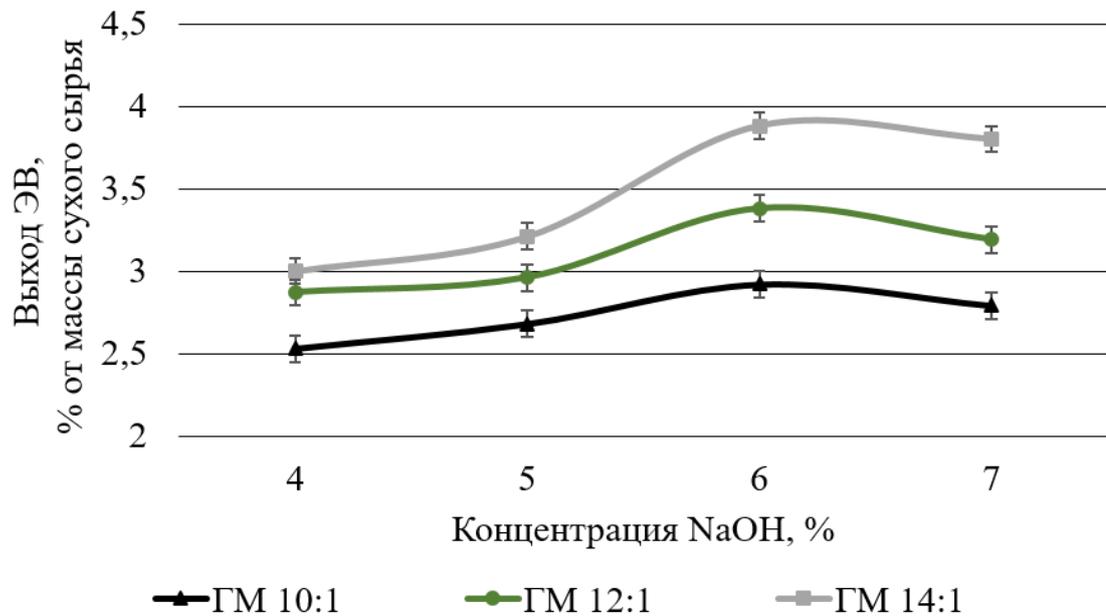


Рисунок 6 – Влияние концентрации NaOH и ГМ на выход ЭВ ДЗ лиственницы

Дальнейшие опыты были проведены с целью определения влияния продолжительности обработки (10-25 мин) на выход ЭВ, при этом, остальные параметры, проявившие наибольшую эффективность извлечения в предыдущих опытах были неизменными (рисунок 7).

При увеличении продолжительности обработки до 25 минут выход ЭВ снижается из-за чрезмерного разогрева смеси.



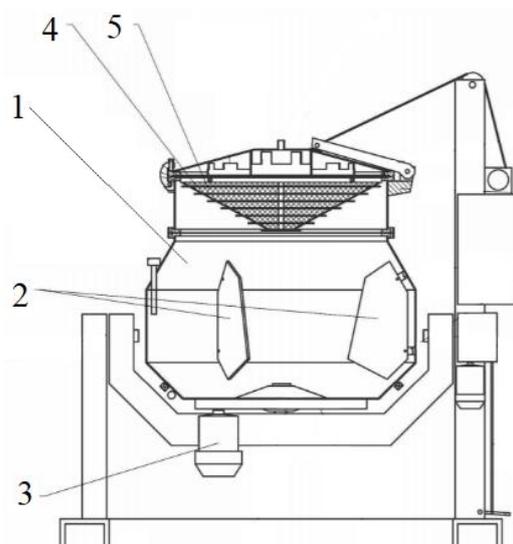
Рисунок 7 – Влияние продолжительности обработки ДЗ лиственницы в РПА на выход ЭВ

В результате проведения всех опытов в заданных пределах технологических параметров, максимальный выход ЭВ ($4,15 \pm 0,16$) % достигается при концентрации водно-щелочного раствора NaOH 6 %, ГМ 14:1 и продолжительности обработки 15 мин.

Выделение экстрактивных веществ из ДЗ сосны и лиственницы в АГТ

Конструкция АГТ (производитель ООО «НТП Института химии Коми НЦ УрО РАН») (рисунок 8) позволяет проводить в одной емкости-экстракторе (1) различные технологические операции с высокой эффективностью извлечения веществ и разделения фаз.

Корпус аппарата объемом 500 л выполнен в виде барабана грушевидной формы, вращающегося под углом. В барабане имеются лопатки (2), изогнутые в сторону вращения. При вращении наклонного барабана сырье поднимается лопастями, а затем под действием гравитационных сил падает, что обеспечивает интенсификацию массообменных процессов за счет улучшения гидродинамических условий экстракции [171].



1 – экстрактор, 2-лопатки, 3-электродвигатель, 4, 5 – фильтры, встроенные в крышку

Рисунок 8 – Схема установки АГТ

Экстракцию ДЗ сосны и лиственницы в АГТ проводили при ГМ 10:1, температуре 50 °С, продолжительности экстракции 4 ч, концентрации NaOH 4 и 5 % (рисунок 9, 10). Условия аналогичны опытам предыдущей серии экспериментов в лабораторном аппарате, при которых достигался максимальный выход экстрактивных веществ [149].

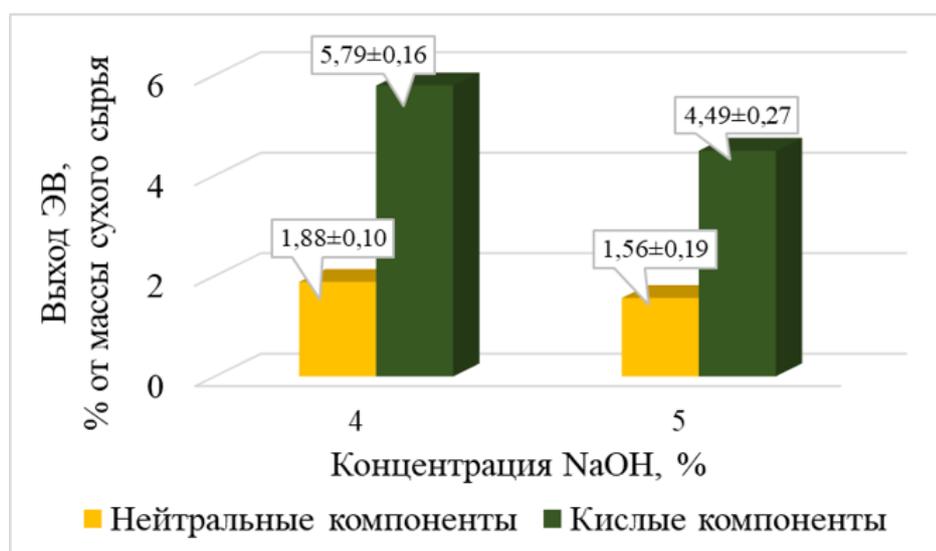


Рисунок 9 – Влияние концентрации NaOH на выход ЭВ ДЗ сосны в АГТ

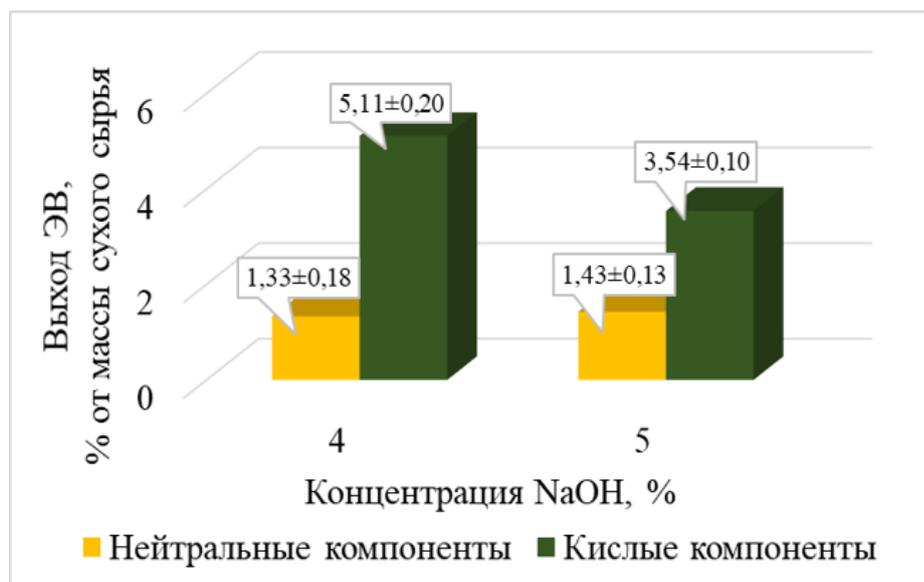


Рисунок 10 – Влияние концентрации NaOH на выход ЭВ ДЗ лиственницы в АГТ

Как следует из данных эксперимента по определению влияния концентрации водно-щелочного раствора NaOH при проведении эмульсионной экстракции ДЗ сосны и лиственницы в АГТ, наибольший выход ЭВ в заданном интервале варьирования концентрации NaOH достигался при использовании 4 % раствора щелочи. Максимальный выход ЭВ ДЗ сосны составил $(7,67 \pm 0,12)$ % от массы сухого сырья, ДЗ лиственницы – $(5,44 \pm 0,2)$ %.

Таким образом, переработка ДЗ сосны и лиственницы методом эмульсионной экстракции на аппарате гравитационного типа обеспечивает получение 165 л экстракта с высоким выходом ЭВ при ГМ 10:1, концентрации NaOH 4 %, продолжительности экстракции 4 ч. Использование роторно-пульсационного аппарата позволяет проводить переработку сырья в небольших объемах за 15-20 минут обработки при ГМ 12:1-14:1 (таблица 8) [172].

Сумма экстрактивных веществ выступает в качестве действующего вещества эмульсионных экстрактов. За 4 часа экстракции в АГТ получено 1294 г действующего вещества из ДЗ сосны и 1062 г из ДЗ лиственницы, за это же время

в РПА наработано 36 л экстракта с 287 г действующего вещества из ДЗ сосны и 155 г из ДЗ лиственницы.

Таблица 8 - Сравнительная характеристика применяемого оборудования для экстракции ДЗ

Параметры	РПА		АГТ	
	Сосна	Лиственница	Сосна	Лиственница
Выход экстрактивных веществ, % от массы сухого сырья	6,65	4,14	7,67	5,44
Выход экстрактивных веществ, г	23,9	12,9	1294	1062
Продолжительность процесса, мин	20	15	240	
Объем получаемого экстракта, л	3		165	
Технологические особенности	Дополнительная сушка и измельчение сырья, проблемы фильтрования		Мобильность аппарата	

Несмотря на длительность процесса экстрагирования в аппарате гравитационного типа, использование данного аппарата является более перспективным за счет большого объема получаемого экстракта, простоты и мобильности оборудования.

3.6 Исследование биологической активности эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы

В Институте биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН были проведены исследования биологической активности фракций нейтральных и кислых компонентов эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы.

- 1** – нейтральные компоненты эмульсионного экстракта ДЗ сосны,
- 2** – кислые компоненты эмульсионного экстракта ДЗ сосны,
- 3** – нейтральные компоненты эмульсионного экстракта ДЗ лиственницы,
- 4** – кислые компоненты эмульсионного экстракта ДЗ лиственницы.

Антирадикальная активность (АРА) образцов была изучена в тесте с ДФПГ, антиоксидантная активность – фосфомолибденовым методом, а также на субстрате, полученном из головного мозга лабораторных животных. Гемолитическая, мембранопротекторная и антиоксидантная активность исследованы с использованием эритроцитов крови млекопитающих.

Известно, что фенольные кислоты отличаются высокой активностью в тесте с ДФПГ, поскольку антирадикальная активность считается основным механизмом антиоксидантного действия фенольных соединений [173].

По-видимому, высокая АРА в тесте с ДФПГ кислых компонентов эмульсионного экстракта древесной зелени хвойных (образцы 2 и 4) (таблица 9) обусловлена присутствием в указанных фракциях существенного количества фенольных кислот. При этом образцы, выделенные из лиственницы, оказались более активными, чем из сосны, что, очевидно, обусловлено как более высокой концентрацией ароматических соединений, так и различиями в качественном составе кислот. Высокая АРА *n*-гидроксibenзойной, *n*-кумаровой и феруловой кислот известна из литературы [136, 173]. Все исследованные образцы обладали статистически значимой антиоксидантной активностью на модели Fe^{2+} /аскорбат-инициированного ПОЛ (таблица 9). По способности ингибировать окисление ненасыщенных жирных кислот животных липидов лидировали образцы 2, 3 и 4. Именно они при концентрации 0,5 мг/мл максимальным образом снижали накопление вторичных продуктов ПОЛ (ТБК-АП) в инкубационной среде по сравнению с контролем.

Фосфомолибденовый метод также позволил выявить наличие антиоксидантной активности у всех полученных фракций эмульсионных экстрактов (см. таблица 9). Наибольшая общая антиоксидантная активность (ОАА), оцененная по способности восстанавливать Mo^{6+} , обнаружена у Н.К. экстракта лиственницы (образец 3). Сообщается, что высокая активность экстрактов растений в данной модельной системе может быть обусловлена присутствием в них нефенольных компонентов [174, 175].

Таблица 9 - Сравнительная оценка АРА и АОА¹ отдельных фракций эмульсионных экстрактов сосны и лиственницы

Образец	АРА (% ингибирования)		ТБК-АП/нмоль·мл ⁻¹		ОАА, отн. Ед
	c = 0,05 мг/мл	c = 0,5 мг/мл	c = 0,05 мг/мл	c = 0,5 мг/мл	c = 0.05 мг/мл
К	–	–	81,2±1,4	69,9±1,2	
И	–	–	39,2±0,2	38,1±0,2	
1	1,41±0,77	15,73±0,46	64,3±0,4**	30,2±0,5**	4,27±0,24
2	22,14±1,04	81,50±1,55	63,7±0,6**	7,3±0,5**	5,48±0,15
3	2,86±0,17	24,81±0,74 ⁺	61,2±0,7*** ⁺	6,5±0,5*** ⁺	7,24±0,17 ⁺⁺⁺
4	26,07±0,60 ⁺	85,49±0,86 ⁺	64,1±0,6**	7,1±0,4**	4,83±0,13

¹ АОА оценивали двумя методами: 1 – по способности тормозить накопление ТБК-АП в субстрате, полученном из головного мозга мышей на модели Fe²⁺/аскорбат-иницированного ПОЛ (К – концентрация вторичных продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП) в контрольных (без соединений), И – в интактных (без инициированного окисления) образцах). 2 – фосфолибденовым методом (общая антиоксидантная активность, ОАА).

* – различия по отношению к контролю, ⁺ – различия между образцами сосны и лиственницы, ^{***} – p ≤ 0,05 и ⁺⁺⁺ – p ≤ 0,01

Прежде чем перейти к сравнительной оценке мембранопротекторной и антиоксидантной активности образцов на модели окислительного гемолиза эритроцитов, индуцированного H₂O₂, мы провели исследование их гемолитической активности. Показано (рисунок 11), что фракции К.К. эмульсионного экстракта ДЗ сосны и лиственницы (образцы 2 и 4) отличались существенно большей гемолитической активностью по сравнению с нейтральными (образцы 1 и 3), что обусловлено присутствием в их составе фенольных кислот, обладающих поверхностно-активными свойствами. Гемолитическая активность бензойной кислоты и некоторых ее аналогов [176], а также растительных экстрактов, содержащих фенольные кислоты [177] известна из литературы. Нами также показана высокая гемолитическая активность терпенофенолов аналогичной структуры, содержащих свободную карбоксильную группу [178-180]. Отметим, что фракция К.К. эмульсионного экстракта ДЗ сосны оказалась более гемолитически активной по сравнению с соответствующей фракцией лиственницы (рисунок 11), что может быть обусловлено высоким содержанием дитерпеноидов

лабданового строения (пинифоловой кислоты и ее метилового эфира), о цитотоксической активности которых упоминалось выше [181].

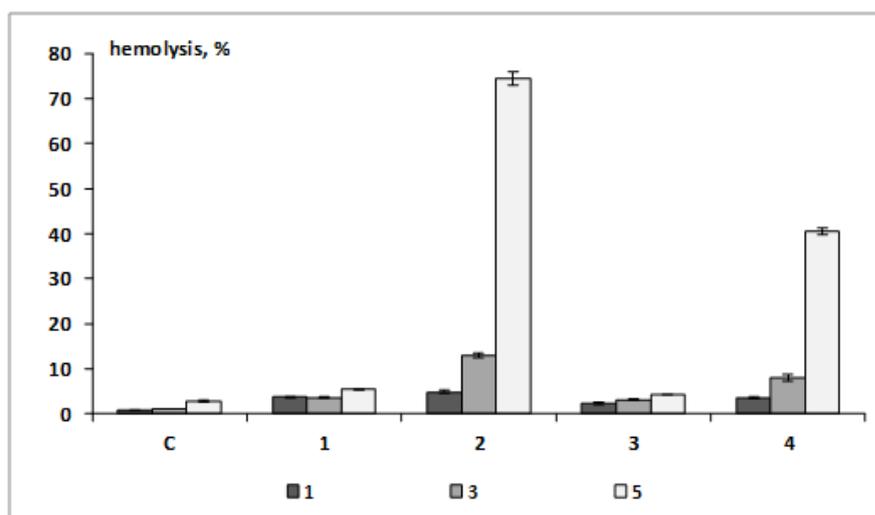


Рисунок 11 - Гемолитическая активность отдельных фракций эмульсионных экстрактов сосны и лиственницы в концентрации 0,05 мг/мл

В связи с высокой гемолитической активностью образцов 2 и 4 в концентрации 0,05 мг/мл исследование мембранопротекторных свойств в указанной концентрации проводили только для фракции Н.К. эмульсионных экстрактов ДЗ 1 и 3 (таблица 10).

Несмотря на статистически значимое ингибирование перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клетках, заметное по уменьшению концентрации ТБК-АП, снижение интенсивности гибели эритроцитов под воздействием H_2O_2 (мембранопротекторная активность) на начальных этапах инкубации наблюдалось лишь в присутствии фракции Н.К. эмульсионного экстракта ДЗ лиственницы (образец 3), но не сосны (образец 1) (таблица 10). Высокая активность образца, полученного из экстракта лиственницы, по сравнению с образцом, выделенным из экстракта сосны, может быть обусловлена более высоким содержанием дитерпеновых спиртов и полипренолов.

Таблица 10 - Антиоксидантная и мембранопротекторная активность отдельных фракций эмульсионных экстрактов сосны и лиственницы в концентрации 0,05 мг/мл на модели H₂O₂-индуцированного гемолиза

Образец	МПА (% гемолиза)					ТБК-АП, нмоль/мл
	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч	
Контроль	35,1±1,7	53,4±1,1	60,7±0,9	65,2±1,0	68,1±1,4	2,88±0,07
1	31,3±1,5	55,0±0,6	67,1±0,5**	72,5±0,5**	74,4±0,3**	2,52±0,08*
3	14,1±0,3**	44,2±1,1**	57,3±1,3	64,9±1,0	69,4±0,5	2,42±0,06**

Поскольку фракция Н.К. экстракта сосны в указанной концентрации не способствовала увеличению выживаемости клеток в условиях острого окислительного стресса, а, напротив, усиливала гемолиз (таблица 10), мы повторили эксперимент, снизив концентрации компонентов экстрактов на порядок (до 0,005 мг/мл). Снижение концентрации позволило также избежать гемолитического эффекта фракции К.К. эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы (образцы 2 и 4) и провести сравнительную оценку мембранопротекторной активности всех четырех образцов (таблица 11).

В концентрации 0,005 мг/мл мембранопротекторной активностью обладали лишь фракции Н.К. и К.К. эмульсионного экстракта лиственницы (образцы 3 и 4) (таблица 11).

Таблица 11 - Мембранопротекторная активность отдельных фракций эмульсионных экстрактов сосны и лиственницы в концентрации 0,005 мг/мл на модели H₂O₂-индуцированного гемолиза

Вариант	МПА (% гемолиза)				
	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч
Контроль	27,8±0,7	45,6±1,0	51,2±0,9	56,4±1,2	60,0±1,5
1	30,0±2,1	51,5±1,5*	58,1±1,6**	63,9±1,2**	68,9±1,3**
2	23,8±1,0**	45,3±1,4	54,4±1,0*	59,9±0,6*	64,7±1,7*
3	18,0±1,6**	37,6±1,9**	45,3±1,8**	50,0±2,4*	54,8±2,3

Продолжение таблицы 11

Вариант	МПА (% гемолиза)				
	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч
4	19,8±0,6**	36,7±1,7**	42,5±1,7**	48,1±1,5**	51,2±1,6**

Компоненты экстракта лиственницы не только снижали интенсивность H₂O₂-индуцированного гемолиза в течение всего периода инкубации клеток, но и статистически значимо уменьшали в эритроцитах концентрацию продуктов окисления гемоглобина (metHb и ferrylHb), что свидетельствует об их высокой антиоксидантной активности в указанной модельной системе (таблица 12).

Таблица 12 - Антиоксидантная активность отдельных фракций эмульсионных экстрактов сосны и лиственницы в концентрации 0,005 мг/мл на модели H₂O₂-индуцированного гемолиза.

Вариант	metHb/oxyHb	ferrylHb/oxyHb
Контроль	0,945±0,021	0,708±0,008
1	1,146±0,054**	0,681±0,015
2	1,015±0,031*	0,595±0,020**
3	0,807±0,021**	0,603±0,008**
4	0,774±0,028**	0,566±0,005**

По комплексу изученных показателей биологической активности полученных экстрактов, наибольшей антиоксидантной активностью отличался экстракт К.К. древесной зелени лиственницы, содержащий в составе соединения ароматической природы, в частности преобладали фенолокислоты: *n*-кумаровая и феруловая [182]. Благодаря богатому составу и высокой биологической активности, эмульсионные экстракты из ДЗ сосны и лиственницы могут быть внедрены в разработку новых природных препаратов для эффективного использования в растениеводстве и животноводстве, лесовоспроизводстве, фармакологии.

Изучение влияния эмульсионного экстракта ДЗ сосны на рост семян овса методом водно-бумажной культуры

Для исследования биологической активности эмульсионного экстракта ДЗ сосны были проведены опыты по проращиванию семян овса методом водно-бумажной культуры. Перед проращиванием семена в течение 24 часов замачивали в дистиллированной воде (контроль) и в экстракте сосны, разведенной в воде в соотношении (от 1:10000 до 1:1 с увеличением доли экстракта). Критерием оценки служили показатели всхожести (рисунок 12), высоты проростков и длины корней.

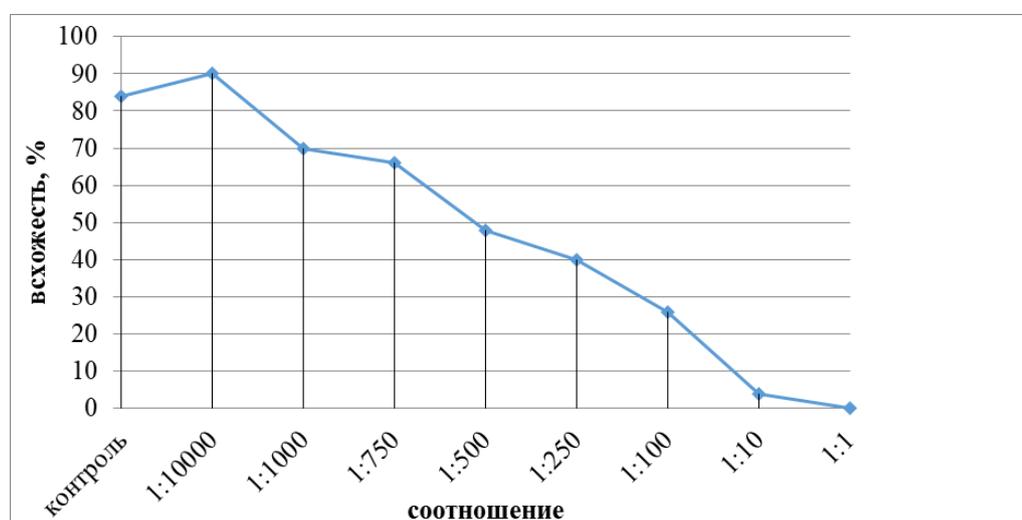


Рисунок 12 - Изменение количества проросших семян, в зависимости от соотношения экстракта к дистиллированной воде

Высокая всхожесть (90%) отмечена при обработке семян овса раствором экстракта при соотношении 1:10000 (приложение Д). Повышение дозы оказало угнетающее действие на всхожесть овса. Самое значительное влияние на формирование корней оказал раствор экстракта в соотношении 1:500. Максимальная длина корней увеличилась на 2,9 см в сравнении с контролем и составила 14,5 см (таблица 13).

Таблица 13 – Влияние соснового экстракта на всхожесть семян, образование корней и листовых пластинок овса

Варианты	Максимальная длина корней, см	Максимальная длина листьев, см
Контроль (дист.вода)	11,6	14,3
1:10000	10,4	12,1
1:1000	10,6	10,6
1:750	10,6	10,7
1:500	14,5	13,3
1:250	8,6	12,5
1:100	14,1	10,0
1:10	2,5	4,6
1:1	-	-

Таким образом, использование эмульсионного экстракта сосны при максимальном разведении возможно в сельском хозяйстве в качестве стимулятора роста растений, а в более высоких концентрациях – в качестве природного биологически-активного гербицида.

3.7 Предлагаемый вариант переработки ДЗ сосны и лиственницы

На основе полученных данных предложен вариант переработки ДЗ сосны и лиственницы, позволяющий получить несколько продуктов: эмульсионный экстракт и эфирные масла.

По предлагаемому способу измельченное сырье экстрагируется водным раствором NaOH. Далее смесь фильтруется для удаления твердой фазы – проэкстрагированного сырья. Полученный экстракт может использоваться как готовый продукт, или перерабатываться с получением индивидуальных компонентов. Наличие в эмульсионных экстрактах сосны и лиственницы монотерпеноидов, фенольных соединений, полипренолов, дитерпеновых и жирных кислот, микроэлементов и других биологически активных веществ предопределяет

их применение в качестве лекарственного средства в фармакологии, растениеводстве и животноводстве.

При необходимости проводится концентрирование эмульсионного экстракта. После чего остается конденсат, который может быть использован для дальнейшей переработки с получением таких ценных продуктов, как эфирные масла.

Проекстранированное сырье содержит минеральные компоненты, липофильные и фенольные соединения, не перешедшие в водный раствор щелочи. Такой продукт может быть использован как удобрение и минеральная подкормка для овощных, цветочных культур и как кормовая добавка в рацион сельскохозяйственных животных и птиц.

ВЫВОДЫ

1. Впервые экологически безопасным методом эмульсионной экстракции выделены экстрактивные соединения ДЗ сосны и лиственницы. Подобраны оптимальные условия эффективного выделения экстрактивных веществ в лабораторных условиях.

2. Выходы экстрактивных веществ в оптимальных условиях не уступают традиционным методам и составляют: из ДЗ сосны 9,7 % от массы сухого сырья, из ДЗ лиственницы – 6,94 % от массы сухого сырья.

3. Исследования химического состава эмульсионных экстрактов ДЗ сосны и лиственницы показали, что эмульсионным методом выделяются ценные природные соединения, обладающие широким спектром биологической активности.

4. Впервые показано, что мажорными компонентами эмульсионного экстракта ДЗ сосны являются пинифоловая кислота и изоабиенол, ДЗ лиственницы – *n*-кумаровая кислота.

5. Определены оптимальные условия эмульсионной экстракции хвойного сырья в гравитационном и роторно-пульсационном аппаратах.

6. Установлено, что фракции эмульсионных экстрактов исследованных хвойных пород обладают высокой антиоксидантной активностью.

7. Благодаря богатому составу и высокой биологической активности, эмульсионные экстракты древесной зелени сосны и лиственницы перспективны для применения в качестве биологически активных препаратов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Милютин, Л. И. Биоразнообразие лиственниц России / Л. И. Милютин // Хвойные бореальной зоны. – 2003. – № 1. – С. 6–9.
2. Савин, Е. Н. Лиственница в лесных полосах / Е. Н. Савин, В. Р. Романенко, В. Г. Ступников ; отв. ред. В. Н. Смагин ; Акад. наук СССР, Сиб. отделение, Ин-т леса и древесины им. В. Н. Сукачева. – Красноярск : ИЛИД СО АН СССР, 1988. – 92 с.
3. Панькив, О. Г. Динамика липидов и их некоторых компонентов древесной зелени лиственницы сибирской / О. Г. Панькив, В. Н. Паршикова, Д. Г. Слащенин, Р. А. Степень // Химия растительного сырья. – 2009. – № 3. – С. 99–102.
4. Черняева, Г. Н. Утилизация древесной биомассы / Г. Н. Черняева, С. Я. Долгодворова, Р. А. Степень ; отв. ред. Б. С. Чудинов ; АН СССР, Сиб. отделение, Ин-т леса и древесины им. В. Н. Сукачева. – Красноярск : ИЛИД, 1987. – 165 с.
5. Левин, Э. Д. Переработка древесной зелени / Э. Д. Левин, С. М. Репях. – Москва : Лесная промышленность, 1984. – 118 с.
6. Чекушина, Н. В. Состав эфирного масла лиственницы сибирской / Н. В. Чекушина, Н. В. Шаталина, А. А. Ефремов // Химия растительного сырья. – 2008. – № 3. – С. 103–105.
7. Трошина, А. В. Состав эфирных масел из отдельных частей кроны лиственницы сибирской (*Larix sibirica* LDB) / А. В. Трошина, В. И. Рощин // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья : матер. 5 Всерос. конф. с междунар. участием. – Барнаул, 2012. – Т. 1. – С. 225–228.
8. Holm, Y. Variation and inheritance of monoterpenes in *Larix* species / Y. Holm, R. Hiltunen // Flavour and fragrance journal. – 1997. – Vol. 12, № 5. – P. 335–339.
9. Пентегова, В. А. Терпеноиды хвойных растений / В. А. Пентегова, Ж. В. Дубовенко, В. О. Ралдугин, Э. Н. Шмидт ; отв. ред. А. А. Семенов ; АН СССР Сиб. отделение, Новосиб. ин-т орган. химии. – Новосибирск : Наука, 1987. – 95 с.

10. Громыко, О. С. Продуктивность лиственницы гмелина (*Larix Gmelinii* (Rupr) Rupr.) и ее хозяйственное значение : автореф. дис. ... канд. биол. Наук : 06.03.03 / Громыко Оксана Сергеевна ; ФГУ «ДальНИИЛХ». – Уссурийск, – 2009. – 22 с.
11. Громыко, О. С. Исследование отходов лесозаготовок для получения биологически активных веществ / О. С. Громыко, Ю. Г. Тагильцев, С. В. Караваев, [и др.] // Фальцфейновские чтения : матер. IV междунар. конф. : в двух томах. – Херсон, 2005. – Т. 2 – С. 168–170.
12. Латыш, В. Г. Эфирное масло лиственницы как признак при диагностировании видов и экотипов и их отборе для культур в Центральной лесостепи : автореф. дис. канд. с.-х. наук : 06.03.01 / Латыш Владимир Григорьевич ; ВГУ. – Воронеж, 1979. – 23 с.
13. Колесникова, Р. Д. Эфирные масла дальневосточных хвойных растений / Р. Д. Колесникова, Ю. Г. Тагильцев. — Хабаровск : ХКЦПЗ, 1999. — 228 с.
14. Транчук, Н. В. Крона лиственницы сибирской — сырье для биорефайнинга : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 05.21.03 / Транчук Наталия Владимировна ; ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С. М. Кирова». – Санкт-Петербург, 2018. – 16 с.
15. Ostroukhova, L. A., Investigation of the chemical composition of larch wood resin. / L. A. Ostroukhova, V. A. Raldugin, V. A. Babkin, N. A. Onuchina, A. A. Levchuk // Russian journal of bioorganic chemistry. – 2012. – Vol. 38, № 7, – P. 775–779.
16. Ралдугин, В. А. Цембрановые спирты – новый тип гормональных ингибиторов роста растений / В. А. Ралдугин, В. Е. Козлов, В. М. Чекуров, Н. И. Ярошенко, В. А. Пентегова // Химия природных соединений. – 1981, – № 6. – P. 733–738.
17. Миксон, Д. С. Групповой состав и кислоты хвои лиственницы сибирской разного периода вегетации / Д. С. Миксон, В. И. Роцин // Химия растительного сырья. – 2019. – № 4. – С. 207–214.

18. Миксон, Д. С. Состав сложных эфиров экстрактивных веществ хвои лиственницы сибирской / Д. С. Миксон, В. И. Рощин // Актуальные проблемы лесного комплекса. – 2015. – № 43. – С. 101-105.
19. Левина, Л. М. Состав кислот, извлекаемых из коры лиственницы сибирской / Л. М. Левина, Э. Д. Левин // Химия древесины. – 1975. – № 1. – С. 88–92.
20. Citoglu, G. S. Antifungal Flavonoids from *Ballota glandulosissima* / G. S. Citoglu, B. Sever, S. Antus, E. Baitz-Gacs, N. Altanlar // *Pharmaceutical biology*. – 2003. – Vol. 41, № 7. – P. 483–486.
21. Транчук, Н. В. Фенольные соединения древесной зелени лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) / Н. В. Транчук, В. И. Рощин // Актуальные проблемы лесного комплекса. – 2014. – № 38. – С. 132–134.
22. Ivanova, S. Z. Phenolic compounds of Siberian and Dahurian Larch phloem / S. Z. Ivanova, A. G. Gorshkov, A. V. Kuzmin, I. I. Gordienko, V. A. Babkina // *Russian journal of bioorganic chemistry*. – 2012. – Vol. 38. – P. 769–774.
23. Бабкин, В. А. Безотходная комплексная переработка биомассы лиственниц сибирской и даурской / В. А. Бабкин, Л. А. Остроухова, С. Г. Дьячкова, Ю. К. Святкин, Д. В. Бабкин, Н. А. Онучина // Химия в интересах устойчивого развития. – 1997. – № 5. – С. 105–115.
24. Galochkina, A. V. Virus-inhibiting activity of dihydroquercetin, a flavonoid from *Larix sibirica*, against coxsackievirus B4 in a model of viral pancreatitis / A. V. Galochkina, V. B. Anikin, V. A. Babkin, L. A. Ostrouhova, V. V. Zarubaev // *Archives of virology*. – 2016. – Vol. 161. – P. 929–938.
25. Транчук, Н. В. 5,4 –дигидрокси-3,7-диметоксифлавонол хвои лиственницы сибирской / Н. В. Транчук, В. И. Рощин // Актуальные проблемы химии, биотехнологии и сферы услуг. – 2017. – С. 97–101.
26. Тюкавкина, Н. А. Фенольные соединения хвои *Larix Dahurica* Turcz. / Н. А. Тюкавкина, С. А. Медведева, С. З. Иванова // Химия древесины. – 1975. – № 1. – С. 93–95.

27. Медведева, С. А. Фенолокислоты и их гликозиды в хвое некоторых видов Pinaceae / С. А. Медведева, С. З. Иванова, Н. А. Тюкавкина // Химия древесины. 1977. – № 3. – С. 93–95.
28. Иванова, С. З. Ацетофеноны хвои некоторых видов семейства Pinaceae / С. З. Иванова, С. А. Медведева, Н. А. Тюкавкина // Химия древесины. – 1978. – № 1. – С. 103-108.
29. Afifi, F. Antifungal Flavonoids from *Varthemia phionoides* / F. Afifi, S. Al-Khalil, B. K. Abdul-Haq // *Phytotherapy research*. – 1991. – Vol. 5. – P. 173–175.
30. Лаур, Н. В. Происхождение, распространение, систематика и некоторые подходы при селекции *Pinus Sylvestris* L. / Н. В. Лаур, А. П. Царев // Вестник московского государственного университета леса - лесной вестник. – 2012. – №2. – С. 8–13.
31. Arrabal, C. Characterization of two chemotypes of *Pinus pinaster* by their terpene and acid patterns in needles / C. Arrabal, M. C. Garcia-Vallejo, E. Cadahia, M. Cortijo, B. F. de Simon // *Plant systematics and evolution*. – 2012. – Vol. 298. – P. 511–522.
32. Manninen, A. M. Comparing the variation of needle and wood terpenoids in scots pine provenances / A. M. Manninen, S. Tarharnen, M. Vuorinen, P. Kainulainen. // *J. Chem. Ecol.* – 2002. – Vol. 28. – P. 211–228.
33. Arrabal, C. Seasonal variations of lipophilic compounds in needles of two chemotypes of *Pinus pinaster* / C. Arrabal, M. C. Garcia-Vallejo, E. Cadahia, M. Cortijo, B. F. Simon // *Ait. Plant Syst. Evol.* – 2014. – Vol. 300. – P. 359–367.
34. Ткаченко, К. Г. Эфиромасличные растения и эфирные масла: достижения и перспективы, современные тенденции изучения и применения / К. Г. Ткаченко // Вестник Удмуртского университета. – 2011. – № 1. – С.88-100.
35. Шанина, Е. В. Выделение экстрактивных веществ водно-этанольными растворами из древесной зелени *Pinus silvestris* / Е. В. Шанина, С. М. Репях // Химия растительного сырья. – 2003. – № 1. – С. 61-63.

36. Чекушкина, Н. В. Фракционный состав эфирного масла сосны обыкновенной / Н. В. Чекушкина, Т. В. Невзорова, А. А. Ефремов // Химия растительного сырья. – 2008. – № 2. – С. 87–90.
37. Raal, A. Selectivity of *Pinus sylvestris* extract and essential oil to estrogeninsensitive breast cancer cells *Pinus sylvestris* against cancer cells / A. Raal, N. T. Hoai, H. V. Duc, D. T. Thao, A. Orav // *Pharmacognosy magazine*. – 2015. – Vol. 11. – P. 290–295.
38. Tumen, I. Yields and constituents of essential oil from cones of *Pinaceae* spp. natively grown in Turkey / I. Tumen, H. Hafizoglu, A. Kilic, I. E. Donmez, H. Sivrikaya, M. Reunanen // *Molecules*. – 2010. – Vol. 15. – P. 5797–5806.
39. Ioannou, E. The genus *Pinus*: a comparative study on the needle essential oil composition of 46 pine species / E. Ioannou, A. Koutsaviti, O. Tzakou, V. Roussis // *Phytochemistry reviews*. – 2014. – Vol. 13. – P. 741–768.
40. Karapandzova, M. Essential oils composition of *Pinus peuce* Griseb. (*Pinaceae*) growing on Pelister Mtn., Republic of Macedonia / M. Karapandzova, G. Stefkov, S. Kulevanova // *Maced. Pharm. Bull.* – 2010. – Vol. 56. – P. 13–22.
41. Chaturvedi, R. An abietane diterpenoid is a potent activator of systemic acquired resistance / R. Chaturvedi, B. Venables, R.A. Petros, V. Nalam, M. Li, X. Wang, L.J. Takemoto, J. Shah // *Plant J.* – 2012. – Vol. 71. – P. 1–12.
42. Swiezewska, E. The search for plant polyprenols / E. Swiezewska, W. Sasak, T. Mankowski, W. Jankowski, T. Vogtman, I. Krajewska, J. Hertel, E. Skoczylas, T. Chojnacki // *Acta biochimica polonica*. – 1994. – Vol. 4. – P.221-260.
43. Hannus, K. Polyisoprenols in *Pinus sylvestris* needles / K. Hannus, G. Pensar // *Phytochemistry*. – 1974. – Vol. 13. – P. 2563.
44. Васильев, С.Н. Экстрактивные вещества древесной зелени *Pinus Silvestris* L. / С. Н. Васильев, В. И. Рощин, В. И. Ягодин // *Растительные ресурсы*. – 1995. – Т. 31, № 2. – С. 79–119.
45. У Юй Фенольные соединения кроны дерева сосны обыкновенной (*Pinus silvestris* L.) : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 05.21.03 / У Юй ; С.-Петербург. гос. лесотехн. акад. им. С.М. Кирова. – Санкт-Петербург, 2006. – 20 с.

46. Willför, S. Phenolic and lipophilic extractives in Scots pine knots and stem wood / S. Willför, J. Hemming, M. Reunanen, B. Holmbom // *Holzforschung*. – 2003. – Vol. 57. – P. 359–372.
47. Teng, J. A new labdanic norditerpene from *Pinus sylvestris* / J. Teng, R. Zhang, Y.-W. Zhang, H.-Q. Duan, Y. Takaishi // *Natural product research*. – 2010. – Vol. 24. – P. 1587-1591.
48. Enzell, C.R. Pinifolic acid, a new diterpene acid isolated from *Pinus sylvestris* L / C. R. Enzell, O. Theander // *Acta chemica scandinavica*. – 1962. – Vol. 16. – P 607-614.
49. Бардышев, И. И. Монометилловый эфир пинифоловой кислоты в хвое *Pinus Silvestris* / И. И. Бардышев, А. С. Дегтяренко // *Химия природных соединений*. – 1980. – №4. – С. 573-574.
50. Mofikoya, O. O. Chemical fingerprinting of conifer needle essential oils and solvent extracts by ultrahigh-resolution fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry / O. O. Mofikoya, M. Makinen, J. Jānis. // *ACS Omega*. – 2020. – Vol. 5, № 18. – P. 10543–10552.
51. Norin, T. The constituents of conifer needles / T. Norin, S. Sundin, O. Theander, A. A. Lindberg, I. Lagerlund, L. Ehrenberg // *Acta chemica scandinavica*. – 1971. – Vol. 25. – P. 607–610.
52. Mongrand, S. Taxonomy of gymnospermae: multivariate analyses of leaf fatty acid composition / S. Mongrand, A. Badoc, B. Patouille, C. Lacomblez, M. Chavent, C. Cassagne, J. J. Bessoule // *Phytochemistry*. – 2001. – Vol. 58. – P. 101–115.
53. Makarenko, S. P. Seasonal changes in the fatty acid composition of *Pinus sylvestris* needle lipids / S. P. Makarenko, T. A. Konenkina, G. G. Suvorova, M. V. Oskorbina // *Russian journal of plant physiology*. – 2014. – Vol. 61, № 1. – P. 119–123.
54. Нохсорова, В. В. Состав и содержание липидов и их жирных кислот в хвое *Pinus sylvestris* L. И *Picea obovata* Ledeb. при закаливании к низкой температуре в условиях криолитозоны якутии / В. В. Нохсорова, Л. В. Дударева, К. А. Петров // *Физиология растений*. – 2019. – Т. 66, № 4. – С. 286–294.

55. Алаудинова, Е. В. Липиды меристем лесообразующих хвойных пород Центральной Сибири в условиях низкотемпературной адаптации / Е. В. Алаудинова, П. В. Миронов // Химия растительного сырья. – 2009. – С. 65–76.
56. Kalugina, O. V. Changes in the fatty acid composition of pine needle lipids under the aluminum smelter emissions / O. V. Kalugina, T. A. Mikhailova, L. V. Afanasyeva, V. V. Gurina, M. V. Ivanova // Ecotoxicology. – 2021. – Vol. 30. – P. 2083–2095.
57. Семенова, Н. В. Жирнокислотный состав суммарных липидов хвои и каллусов некоторых хвойных: *Pinus sylvestris* L., *Picea pungens* Engelm., *Pinus koraiensis* Siebold Zucc и *Larix sibirica* Ledeb. / Н. В. Семенова, С. П. Макаренко, В. Н. Шмаков, Ю. М. Константинов, Л. В. Дударева // Биологические мембраны. – 2017. – Т. 34, № 4. – С. 298–306.
58. Запесочная, Г. Г. О-ацилированные флавоноидные гликозиды хвои *Pinus Silvestris* / Г. Г. Запесочная, С. З. Иванова, С. А. Медведева, Н. А. Тюкавкина // Химия природных соединений. – 1978. – № 2. – С. 193–196.
59. Бандюкова, В. А. Фенолокислоты растений, их эфиры и гликозиды / В. А. Бандюкова // Химия природных соединений. – 1983. – № 3. – С. 263–272.
60. Тюкавкина, Н. А. Фенольные экстрактивные вещества рода *Pinus* / Н. А. Тюкавкина, В. И. Луцкий, Н. М. Бородина, А. С. Громова // Химия древесины. – 1973. – № 1. – С. 103–109.
61. Медведева, С. А. Силпин – новый С-метилованный флавоноид из *Pinus Silvestris* / С. А. Медведева, С. З. Иванова, Н. А. Тюкавкина, Г. Г. Запесочная // Химия природных соединений. – 1975. – № 5. – С. 650–653.
62. Kebbi-Benkeder, Z. Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species / Z. Kebbi-Benkeder, F. Colin, S. Dumarcaay, P. Gerardin // Annals of Forest Science. – 2015. – Vol. 72. – P. 277–284.
63. Pietarinen, S. P. Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials / S. P. Pietarinen, S. M. Willfor, M. O. Ahotupa, J. E. Hemming, B. R. Holmbom // Journal of Wood Science. – 2006. – Vol. 52. – P. 436–444.

64. Lindberg, L. E. Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria / L. E. Lindberg, S. M. Willfor, B. R. Holmbom // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2004. – Vol. 31. – P. 137–147.
65. Pan, H. Phenolics from inner bark of *Pinus sylvestris* / H. Pan, L. N. Lundgren // *Phytochemistry*. – 1996. – Vol. 42, № 4. – P. 1185-1189.
66. Lawless, J. Complete illustrated guide to aromatherapy. A practical approach to the use of essential oils for health and well-being / J. Lawless // London: Element. – 2002. – P. 224.
67. Гуринович, Л. К. Эфирные масла: химия, технология, анализ и применение / Л. К. Гуринович, Т. В. Пучкова. – Москва : Школа Косметических Химиков, 2005. – 190 с.
68. Koutsaviti A. Antimicrobial activity of the essential oil of Greek endemic *Stachys spruneri* and its main component, isoabienol / A. Koutsaviti, M. Milenkovic, O. Tzakou // *Natural product communications*. – 2011. – Vol. 6. – P. 277–280.
69. Falara, V. A Copal-8-ol diphosphate synthase from the angiosperm *Cistus creticus* subsp *creticus* is a putative key enzyme for the formation of pharmacologically active, oxygencontaining labdane-type diterpenes / V. Falara, E. Pichersky, A. K. Kanellis // *Plant Physiol*. – 2010. – Vol. 154. – P. 301–310.
70. Kännaste, A. Diterpenoid fingerprints in pine foliage across an environmental and chemotypic matrix: Isoabienol content is a key trait differentiating chemotypes / A. Kännaste, L. Laanisto, L. Pazouki, L. Copolovici, M. Suhorutšenko, M. Azeem, L. Toom, A.-K. Borg-Karlson, Ü. Niinemets // *Phytochemistry*. – 2018. – Vol. 147. – P. 80–88.
71. Cheng, S.-S. Phytochemicals from *Cunninghamia konishii* Hayata act as antifungal agents / S.-S. Cheng, M.-J. Chung, C.-Y. Lin, Y.-N. Wang, S.-T. Chang // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 60. – P. 124–128.
72. Рошин, В. И. Репелент из сосновой древесной зелени против грызунов / В. И. Рошин, Л. А. Колодынская, И. С. Павлунская, Г. Н. Корешкова, Н. В. Кандыдин // *Проблемы использования древесной зелени в народном хозяйстве* – Ленинград : Ленингр. лесотехн. акад., 1984. – С. 62.

73. Benigna, M. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera pauper* / M. Benigna, A. Tincusi Ignacio, L. Jimenez Isabel, M. Bazzocchi Laila, A. Moujir Zulma, P. Mamani Jose, G. Barroso Angel, V. Ravelo Basilio // Hernandez. *Planta Med.* – 2002. – P.808–812.

74. Oliveira dos Santos, A. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil / A. Oliveira dos Santos, E. Izumi, T. Ueda-Nakamura, B. P. Dias-Filho, V. Florencio da Veiga-Junior, C. V. Nakamura. // *Mem Inst Oswaldo Cruz.* – 2013. – Vol. 108. – P.59-64.

75. Kang, M. S. Dehydroabietic acid, a diterpene, improves diabetes and hyperlipidemia in obese diabetic KK-Ay mice / M.S. Kang, S. Hirai, T. Goto, K. Kuroyanagi, Y. I. Kim, K. Ohyama, T. Uemura, J.-Y. Lee, T. Sakamoto, Y. Ezaki, R. Yu, N. Takahashi, T. Kawada // *Biofactors.* – 2009. – V.35. – P. 442–448.

76. Takahashi, N. Dehydroabietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor- γ and stimulates insulin-dependent glucose uptake into 3T3-L1 adipocytes / N. Takahashi, R. Yao, M. S. Kang, M. Senda, C. Ando, K. Nishimura, T. Goto, Sh. Hirai, Y. Ezaki, T. Kawada // *Biofactors.* – 2011. – Vol. 37. – P. 309–314.

77. Savluchinske-Feio, S. Activity of dehydroabietic acid derivatives against wood contaminant fungi / S. Savluchinske-Feio, L. Nunes, P. T. Pereira, A. M. Silva, J.-C. Roseiro, B. Gigante, M. J. M. Curto. // *J. Microbiol. Methods.* – 2007. – Vol. 70. – P. 465–470.

78. Kim, J. The natural phytochemical dehydroabietic acid is an anti-aging reagent that mediates the direct activation of SIRT1 / J. Kim, Y.-J. Kang, J.-Y. Lee, D.-H. Choi, Y.-U. Cho // *No Molecular and Cellular Endocrinology.* – 2015. – Vol. 412. – P. 216–225.

79. Kumar, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications / N. Kumar, N. Goel // *Biotechnol. Rep.* – 2019. – Vol. 24. – P. e00370.

80. Taofiq, O. Phenolic acids, cinnamic acid, and ergosterol as cosmeceutical ingredients: Stabilization by microencapsulation to ensure sustained bioactivity / O. Taofiq, S. A. Heleno, R. C. Calhelha, I. P. Fernandes, M. J. Alves, L. Barros, A. M.

González-Paramás, I. C. F. R. Ferreira, M. F. Barreiro // *Microchem. J.* – 2019. – Vol. 147. – P. 469–477.

81. Saija, A. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents / A. Saija, A. Tomaino, D. Trombetta, A. De Pasquale, N. Uccella, T. Barbuzzi, D. Paolino, F. Bonina // *Int. J. Pharm.* – 2000. – Vol. 199. – P. 39–47.

82. Khoshnam, S. E. Memory deficits and hippocampal inflammation in cerebral hypoperfusion and reperfusion in male rats: Neuroprotective role of vanillic acid / S. E. Khoshnam, A. Sarkaki, M. Rashno, Y. Farbood // *Life Sci.* – 2018. – Vol. 211. – P. 126–132.

83. Sammeturi, M. Protective effects of syringic acid, resveratrol and their combination against isoprenaline administered cardiotoxicity in wistar rats / M. Sammeturi, A. H. Shaik, S. B. R. Bongu, S. Cheemanapalli, A. Mohammad, L. D. Kodidhela // *Saudi J. Biol. Sci.* – 2019. – Vol. 26. – P. 1429–1435.

84. Sajadimajd, S. Advances on natural polyphenols as anticancer agents for skin cancer / S. Sajadimajd, R. Bahramsoltani, A. Iranpanah, J. Kumar Patra, G. Das, S. Gouda, R. Rahimi, E. Rezaei-amiri, H. Cao, F. Giampieri, M. Battino, R. Tundis, M. G. Campos, M. H. Farzaei, J. Xiao // *Pharm. Res.* – 2020. – Vol. 151. – P. 104584.

85. Szkudelska, K. Resveratrol ameliorates inflammatory and oxidative stress in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats / K. Szkudelska, M. Okulicz, I. Hertig, T. Szkudelski // *Biomed. Pharm.* – 2020. – Vol. 125. – P. 110026.

86. Ge, L. Development of active rosmarinic acid-gelatin biodegradable films with antioxidant and long-term antibacterial activities / L. Ge, M. Zhu, X. Li, Y. Xu, X. Ma, R. Shi, D. Li, C. Mu // *Food Hydrocoll.* – 2018. – Vol. 83. – P. 308–316.

87. Chung, Y. C. Magnesium lithospermate B and rosmarinic acid, two compounds present in *Salvia miltiorrhiza*, have potent antiviral activity against enterovirus 71 infections. / Y. C. Chung, F. C. Hsieh, Y. J. Lin, T. Y. Wu, C. W. Lin, C. T. Lin, N. Y. Tang, T. R. Jinn // *Eur. J. Pharm.* – 2015. – Vol. 755. – P. 127–133.

88. Ban, J. Y. 3,4-Dihydroxybenzoic acid from *Smilacis chinae* rhizome protects amyloid β protein (25-35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons / J. Y.

Ban, S. O. Cho, S. Y. Jeon, K. H. Bae, K. S. Song, Y. H. Seong, // *Neurosci. Lett.* – 2007. – Vol. 420. – P. 184–188.

89. Остроухова, Л. А. Определение количественного содержания экстрактивных веществ из древесины, корней и коры деревьев хвойных видов Сибири: лиственницы (*Larix sibirica*), сосны *Pinus sylvestris*, пихты *Abies sibirica*, ели *Picea obovata* и кедра *Pinus sibirica* / Л. А. Остроухова, Т. Е. Федорова, Н. А. Онучина, А. А. Левчук, В. А. Бабкин // *Химия растительного сырья.* – 2018. – №4. – С. 185–195.

90. Ягодин, В. И. Основы химии и технологии переработки древесной зелени / В. И. Ягодин. – Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1981. – 224 с.

91. Ягодин, В. И. Основы безотходной технологии древесной зелени / В. И. Ягодин // Проблемы химической переработки древесного сырья : Сб. тр. : Юбил. вып. / М-во образования Рос. Федерации. С.-Петерб. гос. лесотехн. акад. – Санкт-Петербург : С.-Петерб. гос. лесотехн. акад., 2000. – С. 50–58.

92. Ягодин, В. И. Экстракционная химическая переработка древесной зелени для получения биологически активных веществ. (Обзор) / В. И. Ягодин, В. И. Антонов // *Химия древесины.* – 1983. – № 1. – С. 3–15.

93. Репях, С. М. Экстрактивные вещества древесной зелени / С. М. Репях, Н. А. Чупрова, Н. Д. Барабаш // *Химия древесины.* – 1983. – № 4. – С. 62–65.

94. Пермякова, Г. В. Экстракция коры хвойных пород водно-органическими экстрагентами / Г. В. Пермякова, С. Р. Лоскутов, А. В. Семенович // *Химия растительного сырья.* – 2008. – № 2. – С. 43–46.

95. Stalikas, C. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids / C. Stalikas // *Journal of Separation Science.* – 2007. – № 30. – P. 3268–3295.

96. Backlund, I. Extractive profiles of different lodgepole pine (*Pinus contorta*) fractions grown under a direct seeding-based silvicultural regime / I. Backlund, M. Arshadi, A. J. Hunt, T. M. Attard, U. Bergsten // *Industrial Crops & Products.* – 2014. – Vol. 58. – P. 220–229.

97. Соболев, С. В. Содержание биологически активных веществ водно-этанольных экстрактов из коры осины и изучение их рострегулирующей активности / С. В. Соболев, В. М. Воронин, О. А. Есякова // *Химия растительного сырья*. – 2020. – №1. – С. 373–380.
98. Wang, L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants / L. Wang, C. L. Weller // *Trends in Food Science and Technology*. – 2006. – Vol. 17, № 6. – P. 300–312.
99. Chemat, F. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review / F. Chemat, N. Rombaut, A. Sicaire, A. Meullemiestre, M. Abert-vian // *Ultrasonics sonochemistry*. – 2017. – Vol. 34. – P. 540-560.
100. Shirsath, S. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status / S. R. Shirsath, S. H. Sonawane, P. R. Gogate // *Chemical engineering and processing*. – 2012. – Vol. 53. – P. 10–23.
101. Tiwari, B. K. Ultrasound: a clean, green extraction technology / B. K. Tiwari // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2015. – Vol. 71. – P. 100–109.
102. Vilku, K. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — a review / K. Vilku, R. Mawson, L. Simons, D. Bates // *Innovative food science & emerging technologies*. – 2008. – Vol. 9. – P. 161–169.
103. Rajbhar, K. Polyphenols: methods of extraction / K. Rajbhar, H. Dawda, U. Mukundan // *Scientific Reviews and Chemical Communications*. – 2015. – Vol. 5. – P. 1–6.
104. Ghasemzadeh, A. Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoid compounds and their pharmaceutical activity from curry leaf (*Murraya koenigii* L.) using response surface methodology / A. Ghasemzadeh, H. Z. E. Jaafar, E. Karimi, A. Rahmat // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. – 2014. – Vol. 14. – P. 1– 10.
105. Adje, F. Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction / F. Adje, Y.

F. Lozano, P. Lozano, A. Adima, F. Chemat, E. M. Gaydou // *Industrial Crops & Products*. – 2010. – Vol. 32. – P. 439–444.

106. Do, Q.D. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic* / Q. D. Do, A. E. Angkawijaya, P. L. Tran-Nguyen, L. H. Huynh, F. E. Soetaredjo, S. Ismadji, Y.-H. Ju // *Journal of food and drug analysis*. – 2014. – Vol. 22. – P. 296–302.

107. Dai, J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties / J. Dai, R. J. Mumper // *Molecules*. – 2010. – Vol. 15. – P. 7313–7352.

108. Нарчуганов, А. Н. Экстрактивные вещества лапки хвойных эвенкии, извлекаемые при спиртовой обработке с использованием ультразвука / А. Н. Нарчуганов, А. А. Ефремов, К. Б. Оффан // *Химия растительного сырья*. – 2010. – №1. – С. 105–108.

109. Ghitescu, R. E. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark / R. E. Ghitescu, I. Volf, C. Carausu, A. M. Buhlmann, I. A. Gilca, V. I. Popa // *Ultrasonics sonochemistry*. – 2015. – Vol. 22. – P. 535–541.

110. Hofmann, T. Antioxidant properties assessment of the cones of conifers through the combined evaluation of multiple antioxidant assays / T. Hofmann, E. Visi-Rajczi, L. Albert // *Industrial Crops & Products*. – 2020. – Vol. 145. – P. 1–7.

111. Akanda, M. J. Applications of supercritical fluid extraction (SFE) of palm oil and oil from natural sources / M. J. Akanda, M. Z. Sarker, S. Ferdosh, M. Y. Manap, N. N. Rahman, M. O. Kadir // *Molecules*. – 2012. – Vol. 17, № 12. – P. 1764–1794.

112. Conde, E. Extraction of low-molar-mass phenolics and lipophilic compounds from *Pinus pinaster* wood with compressed CO₂ / E. Conde, J. Hemming, A. Smeds, B. D. Reinoso, A. Moure, S. Willför, J. C. Parajó // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2013. – Vol. 81. – P. 193–199.

113. Reverchon, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter / E. Reverchon, I. De Marco // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2006. – Vol. 38. – P. 146–166.

114. Быков, И. И. Экстрагирование биологически активных веществ из *Zingiber officinale roscoe* в технологии фитопрепаратов (обзор) / И. И. Быков, Д. В. Компанцев, И. М. Привалов // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2017. – Т. 16, № 2. – С. 170–180.

115. Прокопчук, Д. И. Сравнение качественного состава экстрактов листьев лавра, полученных методами сверхкритической флюидной экстракции и СВЧ-экстракции / Д. И. Прокопчук, О. И. Покровский, О. О. Паренаго, С. А. Багателяя, А. А. Марколия, С. А. Покрышкин, В. В. Лунин // Химия растительного сырья. – 2018. – № 3. – С. 169–177.

116. Brglez, E. Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects / E. Brglez Mojzer, M. Knez Hrn, M. Škerget, Ž. Knez, U. Bren. // *Molecules*. – 2016. – № 21. – P. 1–38.

117. Bukhanko, N. Extraction of cones, branches, needles and bark from Norway spruce (*Picea abies*) by supercritical carbon dioxide and soxhlet extractions techniques / N. Bukhanko, T. Attar db, M. Arshadia, D. Erikssona, V. Budarin b // *Industrial Crops & Products*. – 2020. – Vol. 145. – 112096.

118. Bertaud, F. Volatile terpene extraction of spruce, fir and maritime pine wood: supercritical CO₂ extraction compared to classical solvent extractions and steam distillation / F. Bertaud, Ch. Crampon, E. Badens // *Holzforschung*. – 2017. – Vol. 71. – P. 667–673.

119. Татаринцева, В. Г. Изучение особенностей состава древесной зелени ели приарктического региона Европейской части России и возможности ее комплексной переработки / В. Г. Татаринцева, Н. А. Кутакова, И. Н. Зубов // Химия растительного сырья. – 2019. – №3. – С. 69–77.

120. Khaw, K. Y. Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: A review / K. Y. Khaw, M. O. Parat, P. N. Shaw, J. R. Falconer // *Molecules*. – 2017. - Vol. 22. – P. 1–24.

121. Talmaciu, A. I. Isolation of bioactive compounds from spruce bark waste using sub- and supercritical fluids / A. I. Talmaciu, M. Ravber, Z. Knez, V. I. Popa // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2016. – Vol. 117. – P. 243–251.

122. Wagner, M. E. Supercritical fluid extraction of oil from potato chips: two scale comparison and mathematical modeling / M. E. Wagner, J. French, S. S. H. Rizvi // *Journal of food engineering*. – 2013. – Vol. 118. – P. 100–107.

123. Yesil-Celiktas, O. Determination of extractability of pine bark using supercritical CO₂ extraction and different solvents: optimization and prediction / O. Yesil-Celiktas, F. Otto, S. Gruener, H. Parlar // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2009. – Vol. 57. – P. 341–347.

124. Seabra, I. J. High pressure solvent extraction of maritime pine bark: study of fractionation, solvent flow rate and solvent composition / I. J. Seabra, M. Dias, M. E. M. Braga, H. C. de Sousa // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2012. – Vol. 62. – P. 135–148.

125. Kim, J. Sample Preparation for Capillary Electrophoretic Applications / J. Kim, K. Choi, D. S. Chung // *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. – 2012. – Vol. 3. – P. 701–721.

126. Raynie, D. E. Modern extraction techniques / D. E. Raynie // *Analytical Chemistry*. – 2004. – Vol. 76. – P. 4659–4664.

127. Liu, J. Subcritical water extraction of betulinic acid from birch bark / J. Liu, P. Chen, W. Yao, J. Wang, L. Wang, L. Deng // *Industrial Crops and Products*. – 2015. – V. 74. – P. 557–565.

128. Mandal, V. Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research / V. Mandal, Y. Mohan, S. Hemalatha // *Pharmacognosy Reviews* – 2007. – Vol. 1. – P. 7–18.

129. Kratchanova, M. The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin / M. Kratchanova, E. Pavlova, I. Panchev // *Carbohydrate Polymers*. – 2004. – Vol. 56. – P. 181–185.

130. Yeoh, S. A comparison of different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels / S. Yeoh, S. Zhang, J. Shi, T. A. Langrish // *Chemical Engineering Communications*. – 2008. – Vol. 195. – P. 511–520.

131. Zhou, T. Identification of volatile compounds in *Chrysanthemum morifolium* by microwave distillation solid-phase microextraction coupled with GC/MS

/ T. Zhou, B. Yang, H. Zhang, Y. Yu, B. Chen, Y. Chen // *Journal of AOAC International*. – 2009. – Vol. 92. – P. 855–861.

132. Pan, Y. M. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of *Buddleia officinalis* and its major active component / Y. M. Pan, C. H. He, H. S. Wang, X. W. Ji, K. Wang, P. Z. Liu // *Food Chemistry*. – 2010. – Vol. 121. – P. 497–502.

133. Veggi, P. C. Fundamentals of Microwave Extraction, in *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice* / P. C. Veggi, J. Martinez, M. A. A. Meireles // *Food Engineering*. – 2013. – Vol. 4. – P. 15.

134. Vampouli, A. Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. *chia* leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition / A. Vampouli, K. Kyriakopoulou, G. Papaefstathiou, L. Vasiliki, M. Krokida, K. Magoulas // *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. – 2014. – Vol. 1. – P. 81–91.

135. Колесников, А. Л. Технический анализ продуктов органического синтеза / А. Л. Колесников. – Москва : М-во высш. и сред. спец. образования РСФСР. Всесоюз. заоч. хим.-технол. техникум. – Росвузиздат, 1963. – 119 с. : черт.; 22 см. – Библиогр.: с. 22.

136. Sevgi, K. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids / K. Sevgi, B. Tepe, C. Sarikurkcu // *Food and chemical toxicology*. – 2015. – Vol. 77. – P. 12–21.

137. Acker, C. I. Antioxidant effect of alkynylselenoalcohol compounds on liver and brain of rats in vitro / C. I. Acker, R. Brandão, A. R. Rosário, C. W. Nogueira // *Environmental toxicology and pharmacology*. – 2009. – Vol. 28. – P. 280–287.

138. Stefanello, S. T. Evaluation of in vitro antioxidant effect of new mono and diselenides / S. T. Stefanello, A. S. Prestes, T. Ogunmoyole, S. M. Salman, R. S. Schwab, C. R. Brender, L. Dornelles, J. B. T. Rocha, F. A. A. Soares // *Toxicology in vitro*. – 2013. – Vol. 27. – P. 1433–1439.

139. Asakawa, T. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides / T. Asakawa, S. Matsushita // *Lipids*. – 1980. – Vol. 15. – P. 137–140.

140. Takebayashi, J. A Method for Evaluation of Antioxidant Activity Based on Inhibition of Free Radical- induced Erythrocyte Hemolysis / J. Takebayashi, J. Chen, A. Tai // *Methods in Molecular Biology. Advanced Protocols in Oxidative Stress II.* – 2010. – Vol. 594. – P. 287–296.

141. Van den Berg, J.J.M. Kinetics and site specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells / J. J. M. Van den Berg, J. A. F. Kamp, B. H. Lubin, Roelofsen, B. F. A. Kuypers // *Free radical biology and medicine.* – 1992. – Vol. 12. – P. 487–498.

142. Chemat, F. Green extraction of natural products: Concept and principles / F. Chemat, M. A. Vian, G. Cravotto // *International Journal of Molecular Sciences* – 2012. – Vol. 13. – P. 8615–8627.

143. Карманова, Л. П. Экстракция водным раствором основания как основа новой технологии получения фунгицидов и стимуляторов роста растений / Л. П. Карманова, А. В. Кучин, А. А. Королёва, Т. В. Хуршкайнен, В. А. Кучин // *Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения.* – 2002. – № 7. – С. 61–64.

144. Хуршкайнен, Т. В. Сравнительная оценка экстракционного оборудования для эффективного выделения экстрактивных веществ хвойной древесной зелени / Т. В. Хуршкайнен, Н. Н. Скрипова, А. В. Кучин // *Теоретическая и прикладная экология.* – 2017. – № 1. – С.25–30.

145. Патент № 2298327 Российская Федерация, МПК А01N 65/00 (2006.01), А01P 21/00, А01P 3/00. Регулятор роста растений с фунгицидным действием «Вэрва» : № 2006101648/04 : заявл. 20.01.2006 : опубл. 10.05.2007 / Кучин А. В., Карманова Л. П., Королёва А. А., Хуршкайнен Т. В., Сычёв Р. Л. – 19 с.

146. Богданович, Н. И. Планирование эксперимента в примерах и расчетах / Н. И. Богданович, Л. Н. Кузнецова, С. И. Третьяков, В. И. Жабин. – Архангельск : АГТУ, 2010. – 126 с.

147. Пономарев, В. Д. Экстрагирование лекарственного сырья / В. Д. Пономарев. – Москва : Изд-во Медицина, 1976. – 203 с. : ил.; 21 см. – Библиогр.: с. 73.

148. Левин, Б. Д. Влияние гидромодуля на выход биологически активных веществ / Б. Д. Левин, А. С. Федюлин // Вестник КрасГАУ. – 2006. – № 2. – С. 266–269.
149. Никонова, Н. Н. Математическое планирование эксперимента для оптимизации выделения экстрактивных веществ из древесной зелени *Pinus Sylvestris* / Н. Н. Никонова, Т. В. Хуршкайнен, А. В. Кучин // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. – 2021. – Вып. 235. – С. 221-237.
150. Патент № 2238291 Российская Федерация, МПК С 09F 1/00, С 11В 1/10 В. Способ переработки растительного сырья : № 2003117227/04 : заявл. 06.06.2003 : опубл. 20.10.2004 / Роцин В. И., Султанов В. С. – 14 с.
151. Routa, J. Influence of storage on the physical and chemical properties of Scots pine bark / J. Routa, H. Brännström, J. Hellström, J. Laitila // BioEnergy Research. – 2021. – Vol. 14. – P. 575–587.
152. Seki, K. Accumulation of constitutive diterpenoids in the rhytidome and secondary phloem of the branch bark of *Larix gmelinii* var. *japonica* / K. Seki, K. Orihashi, M. Sato, M. Kishino, N. Sait. // The Japan Wood Research Society. – 2012. – № 58. – P. 437–445.
153. Xue, J. J. Novel antibacterial diterpenoids from *Larix chinensis* Beissn / J. J. Xue, C. Q. Fan, L. Dong, S. P. Yang, J. M. Yue // Chem. Biodiversity. – 2004. Vol. 1. – P. 1702–1707.
154. González, M. A. Synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid derivatives / M. A. González, D. Pérez-Guaita, J. Correa-Royero, B. Zapata, L. Agudelo, A. Mesa-Arango, L. Betancur-Galvis // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2010. – № 45. – P. 811–816.
155. Миксон, Д. С. Углеводороды и сложные эфиры из опавшей хвои лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ldb.) / Д. С. Миксон, В. И. Роцин // Актуальные проблемы лесного комплекса. – 2018. – № 52. – С. 39–43.
156. Zhang, Q. Synthesis and biological activity of polyprenols / Q. Zhang, L. Huang, C. Zhang, P. Xie, Y. Zhang, Sh. Ding, F. Xu // Fitoterapia. – 2015. – Vol. 106. – P. 184–193.

157. Grishko, V. V. Polyprenols and dolichols from the needles, needle-free shoots, and bark of *Pinus sibirica* / V. V. Grishko, V. A. Raldugin, L. I. Demenkova // *Chemistry of Natural Compounds*. – 1994. – Vol. 30. – P. 676–679.

158. Миксон, Д. С. Углеводороды и сложные эфиры экстрактивных веществ хвои лиственницы сибирской / Д. С. Миксон, В. И. Рощин // *Изв. вузов. Лесной журнал*. – 2021. – № 3. – С.170–185.

159. Soodabeh, S. The story of Beta-sitosterol – A Review / S. Soodabeh, M. Azadeh, R. Ahmad, A. Mohammad // *European Journal of Medical Plants*. – 2014. – Vol. 4. – P. 591–609.

160. Shahriar, M. Isolation and identification of different compounds from *Citrus assamensis* leaf. / M. Shahriar, M. A. Bhuiyan, Md. S. Rana // *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 44. – P. 85–93.

161. Скаковский, Е. Д. ЯМР-анализ эфирных масел хвои интродуцированных видов *Abies* (Pinaceae) / Е. Д. Скаковский, Л. Ю. Тычинская, О. А. Молчанова, С. А. Ламоткин, А. Г. Шутова // *Известия Национальной Академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. – 2013. – С. 22–27.

162. Ozgenc, O. Comparative phytochemical analysis of volatile organic compounds by SPME-GC-FID/MS from six coniferous and nine deciduous tree bark species grown in Turkey / O. Ozgenc, S. Durmaz, G. Celik, B. Korkmaz, N. Yayl // *South African Journal of Botany*. – 2017. – Vol. 113. – P. 23–28.

163. Shpatov, A. V. Composition and bioactivity of lipophilic metabolites from needles and twigs of korean and siberian pines (*Pinus koraiensis* Siebold & Zucc. and *Pinus sibirica* Du Tour) / A. V. Shpatov, S. A. Popov, O. I. Salnikova, T. P. Kukina, E. N. Schmidt, B. H. Um // *Chemistry & biodiversity*. – 2017. – Vol. 14. – e1600203.

164. Westfelt, L. High-boiling neutral constituents from the wood of *Pinus silvestris* L. / L. Westfel // *Acta chemica Scandinavica*. – 1966. – Vol. 20. – P. 2829 – 2840.

165. Скаковский, Е. Д. Состав живицы сосен подрода *Pinus*, изученный методом ЯМР / Е. Д. Скаковский, Л. Ю. Тычинская, Е. И. Гапанькова, И. А.

Латышев, А. Г. Шутова, С. Н. Шиш, С. А. Ламоткин // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. – 2021. – № 237. – С. 242–257.

166. Никонова, Н. Н. Нейтральные компоненты эмульсионного экстракта из древесной зелени сосны / Н. Н. Никонова, Т. В. Хуршкайнен, А. В. Кучин // Бутлеровские сообщения. – 2021. – Т. 68. – № 12. – С. 128-135.

167. Роцин, В. И. Состав, строение и биологическая активность терпеноидов из древесной зелени хвойных растений: дисс. ... док. хим. наук: 05.21.03 / Виктор Иванович Роцин. – Санкт-Петербург, 1995. – 406 с.

168. Никонова, Н. Н. Дитерпеновые кислоты древесной зелени *Pinus silvestris* L. / Н. Н. Никонова, Т. В. Хуршкайнен, А. В. Кучин // Бутлеровские сообщения. – 2016. – Т. 47. – № 9. – С. 25-28.

169. Василишин, М. С. Экстракция арабиногалактана из опилок лиственницы сибирской в аппарате роторно-пульсационного типа / М. С. Василишин, В. В. Будаева, А. Г. Карпов, А. А. Кухленко, О. С. Иванов, С. Е. Орлов, В. А. Бабкин, Е. Н. Медведева // Ползуновский вестник. – 2010. – № 4. – С. 168-173.

170. Патент № 2694774 Российская Федерация, МПК В01F 7/28 (2006.01), В01F 3/08 (2006.01), В01F 3/12 (2006.01). Роторный пульсационный аппарат : № 2018128078 : заявл. 31.07.2018 : опубл. 16.07.2019 / Омелянюк М. В., Пахлян И. А., Мелюхов Е. В. – 11 с.

171. Патент на полезную модель № 196119 Российская Федерация, МПК В01D 11/02 (2006.01), В01D 11/02 (2019.08). Мобильный аппарат для эмульсионной экстракции растительного сырья : № 2019135843 : заявл. 08.11.2019 : опубл. 18.02.2020 / Чукичев А. В., Ерофеевский Н. И. – 11 с.

172. Никонова, Н. Н. Технология выделения низкомолекулярных компонентов древесной зелени сосны и лиственницы методом эмульсионной экстракции / Н. Н. Никонова, Т. В. Хуршкайнен, А. В. Кучин // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. – 2022. – Вып. 239. – С. 220-235.

173. Farhoosh, R. Structure–antioxidant activity relationships of *o*-hydroxyl, *o*-methoxy, and alkyl ester derivatives of *p*-hydroxybenzoic acid / R. Farhoosh, S. Johnny,

M. Asnaashari, N. Molaahmadibahraseman, A. Sharif // *Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 194. – P. 128–134.

174. Zengin, G. Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activity of *Ornithogalum narbonense* L. from Turkey: A phytochemical study / G. Zengin, S. Uysal, R. Ceylan, A. Aktumsek // *Industrial Crops & Products*. – 2015. – Vol. 70. – P. 1–6.

175. Saleem, H. Biological, chemical and toxicological perspectives on aerial and roots of *Filago germanica* (L.) huds: Functional approaches for novel phytopharmaceuticals / H. Saleem, T. T. Htar, R. Naidu, N. S. Nawawi, I. Ahmad, M. Ashraff, N. Ahemad // *Food and chemical toxicology*. – 2019. – Vol. 123. – P. 363–373.

176. Mineo, H. Effect of the chemical specificity of benzoic acid and its analogs on osmotic fragility in erythrocytes of Sprague-Dawley rats in vitro / H. Mineo, Ai Ogita, N. Kanayama, M. Kawagishi, E. Sato, N. Yamamoto, K. Arai, M. Izawa // *European journal of pharmacology*. – 2013. – Vol. 702. – P. 142–148.

177. Singh, R. P. Hemolytic activity of aqueous extract of *Livistona chinensis* fruits / R. P. Singh, G. Kaur // *Food and chemical toxicology*. – 2008. – Vol. 46. – P. 553–556.

178. Buravlev, E. V. Membrane protective properties of carboxy derivatives based on 2,6-diisobornyl-4-methylphenol / E. V. Buravlev, I. Yu. Chukicheva, O. V. Sukrusheva, O. G. Shevchenko, A. V. Kutchin // *Russian Chemical Bulletin*. – 2015. – Vol. 64. – P. 1406–1412.

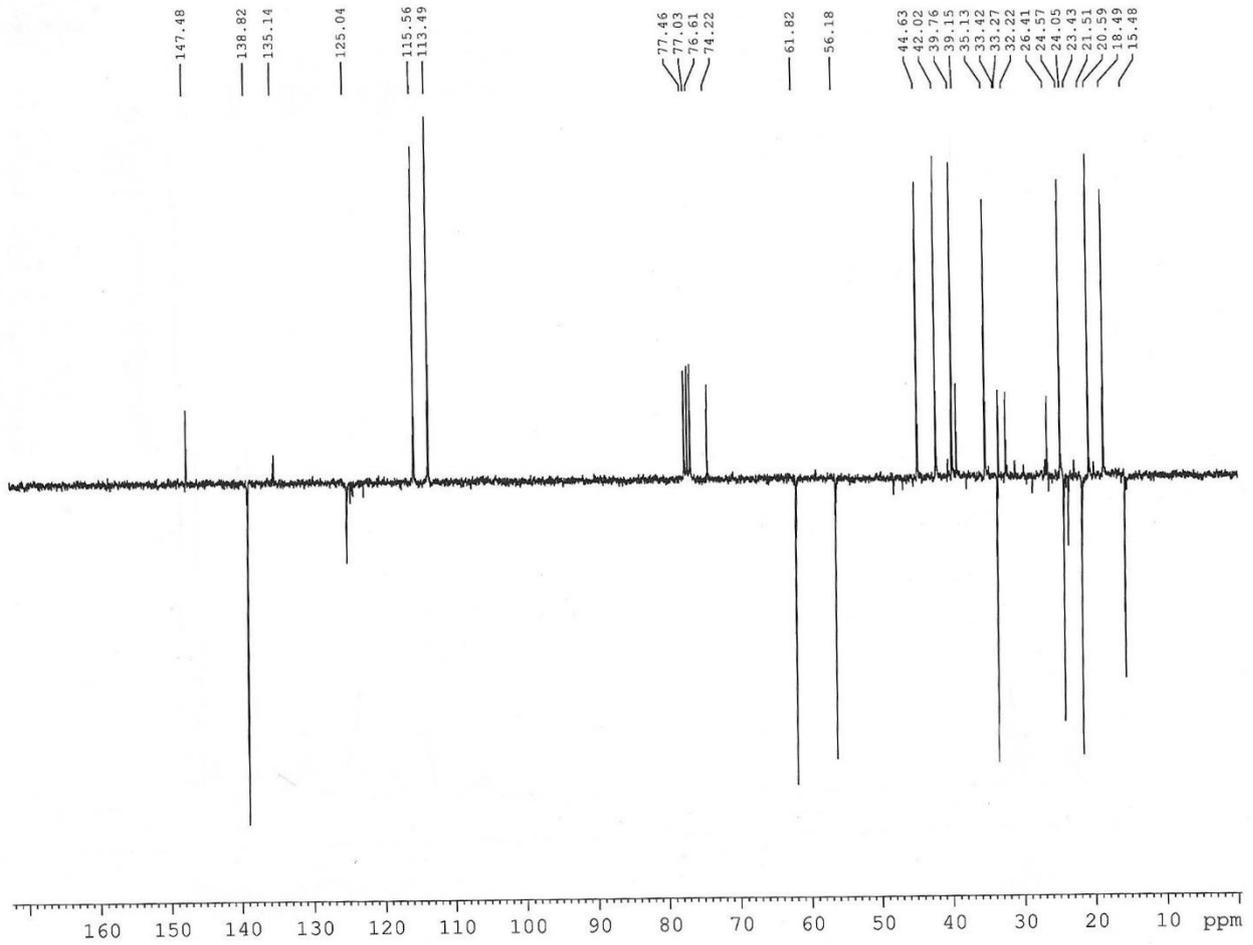
179. Shevchenko, O. G. Structure-hemolytic activity relationship in isobornylphenol derivatives / O. G. Shevchenko, S. N. Plyusnina, E. V. Buravlev, I. Yu. Chukicheva, I. V. Fedorova, O. V. Shchukina, A. V. Kuchin // *Izvestiya akademii nauk seriya khimicheskaya*. – 2017. – Vol. 10. – P. 1881–1890.

180. Dvornokova, I. A. Synthesis and antioxidant properties of hydroxycinnamic acid derivatives Containing isobornyl substituents / I. A. Dvornokova, E. V. Buravlev, I. V. Fedorova, O. G. Shevchenko, I. Yu. Chukicheva, A. V. Kutchin // *Chemistry of natural compounds*. – 2019. – Vol. 55. – P. 658–664.

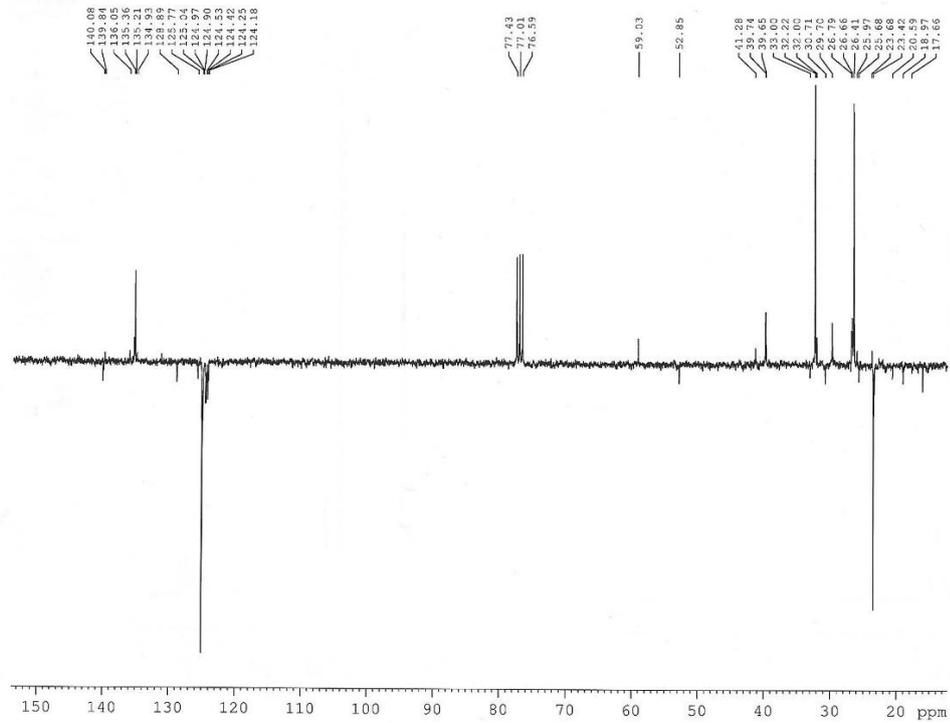
181. Barone, E. Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases / E. Barone, V. Calabrese, C. Mancuso // *Biogerontology*. – 2009. – Vol. 10. – P. 97–108.

182. Nikonova, N. N. “Green technology” processing of pine (*Pinus sylvestris* L.) and larch (*Larix sibirica* Ledeb.) wood greenery to produce bioactive extracts / N. N. Nikonova, T. V. Hurshkainen, O. G. Shevchenko, A. V. Kuchin // *Holzforschung*. – 2022. – Vol. 76. – No. 3. – P. 276-284.

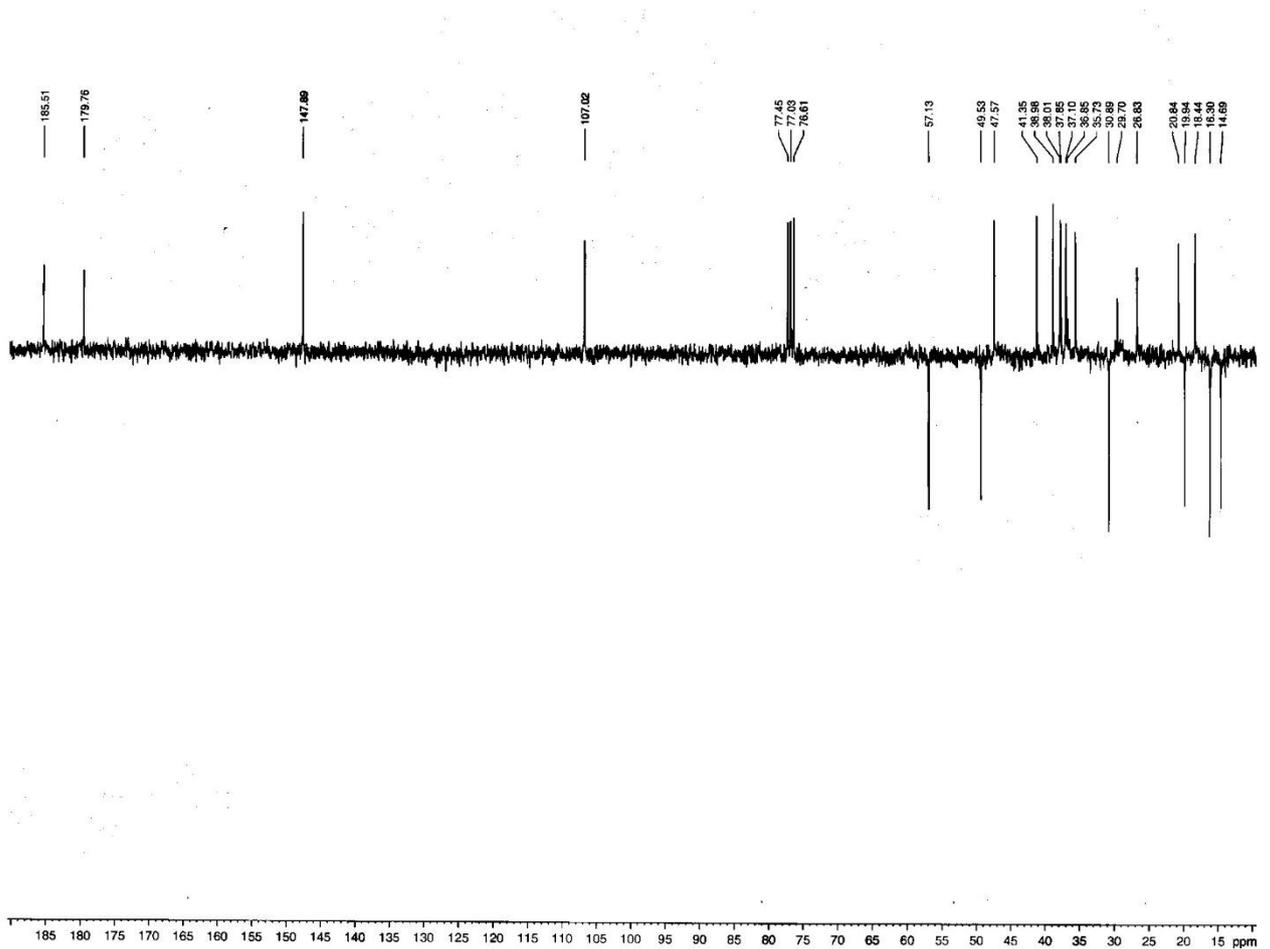
ПРИЛОЖЕНИЕ А

Спектр ЯМР ^{13}C изоабиенола эмульсионного экстракта сосны

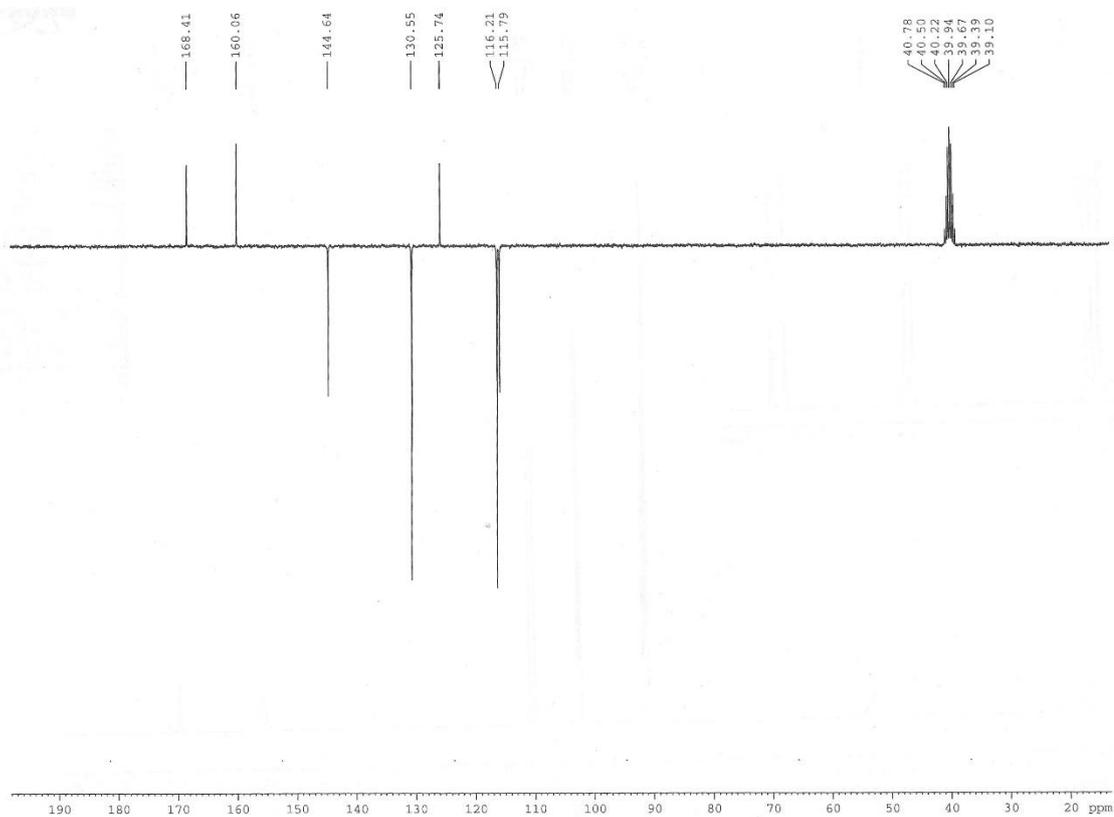
ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Спектр ЯМР ^{13}C полипренолов эмульсионного экстракта лиственницы

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Спектр ЯМР ^{13}C пинифоловой кислоты

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Спектр ЯМР ^{13}C *n*-кумаровой кислоты

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

**Пророщенные семена овса при обработке раствором эмульсионного
экстракта в разведении 1:10000**

