

DOI: 10.17516/1998-2836-0305

EDN: GVSICK

УДК 541.64:547.995.12

Radiation-Thermal Synthesis of Copolymers of Chitosan with Acrylamide as a Means of Betulin Delivering

Mikhail A. Mikhailenko^{*a}, Tatyana P. Shakhtshneider^a,
Il'ya M. Antonov^a, Svetlana A. Myz^a,
Svetlana A. Kuznetsova^b and Alexandr A. Bryazgin^c

*^aInstitute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS
Novosibirsk, Russian Federation*

*^bInstitute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS,
Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center of the SB RAS"
Krasnoyarsk, Russian Federation*

*^cBudker Institute of Nuclear Physics SB RAS
Novosibirsk, Russian Federation*

Received 16.05.2022, received in revised form 23.06.2022, accepted 29.07.2022

Abstract. Graft copolymers of chitosan with acrylamide were obtained by the radiation-thermal method using accelerated electrons. The formation of graft copolymers was confirmed by IR spectroscopy and gel permeation chromatography. It is shown that the efficiency and degree of grafting depend on the dose of ionizing radiation, and pass through a maximum with increasing dose. The conditions for obtaining copolymers with a high yield of the product were found. The resulting copolymers were used to obtain betulin composites using mechanochemical processing. It has been shown that the rate of release of betulin into an aqueous solution during the dissolution of the composite depends on the pH of the solution, which makes it possible to consider mechanocomposites based on copolymers of chitosan with acrylamide as promising means for controlled drug delivery.

Keywords: radiation-thermalsynthesis, chitosan, acrylamide, copolymers, betulin, mechanocomposites, dissolution rate.

Acknowledgements. This work was conducted within the framework of the budget projects 122032900067–4 for ISSCM SB RAS and 121031500180–8 for ICCT SB RAS.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: mikhailenko@solid.nsc.ru



Радиационно-термический синтез сополимеров хитозана с акриламидом как средства доставки бетулина

М. А. Михайленко^а, Т. П. Шахтшнейдер^а, И. М. Антонов^а,
С. А. Мызь^а, С. А. Кузнецова^б, А. А. Брязгин^в

^аИнститут химии твердого тела и механохимии СО РАН
Российская Федерация, Новосибирск

^бИнститут химии и химической технологии СО РАН,
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»
Российская Федерация, Красноярск

^вИнститут ядерной физики им. Г. И. Будкера СО РАН
Российская Федерация, Новосибирск

Аннотация. Радиационно-термическим методом с использованием ускоренных электронов получены привитые сополимеры хитозана с акриламидом. Образование привитых сополимеров подтверждено методами ИК-спектроскопии и гель-проникающей хроматографии. Показано, что эффективность и степень прививки зависят от дозы ионизирующего облучения и с ростом дозы проходят через максимум. Найдены условия получения сополимеров с высоким выходом продукта. Полученные сополимеры использованы для получения композитов бетулина с помощью механохимической обработки. Показано, что скорость выделения бетулина в водный раствор при растворении композита зависит от pH раствора, что позволяет рассматривать механокомпозиты на основе сополимеров хитозана с акриламидом как перспективные средства для контролируемой доставки лекарственных веществ.

Ключевые слова: радиационно-термический синтез, хитозан, акриламид, сополимеры, бетулин, механокомпозиты, скорость растворения.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственных заданий ИХТТМ СО РАН (проект 122032900067–4) и ИХХТ СО РАН (проект 121031500180–8).

Цитирование: Михайленко, М. А. Радиационно-термический синтез сополимеров хитозана с акриламидом как средства доставки бетулина / М. А. Михайленко, Т. П. Шахтшнейдер, И. М. Антонов и др. // Журн. Сиб. федер. ун-та. Химия, 2022, 15(3). С. 420–430. DOI: 10.17516/1998-2836-0305

Хитозан – биополимер, получающийся частичным или полным деацетилированием хитина, одного из самых распространенных природных полисахаридов. В последнее время хитозан

и его производные вызывают все больший интерес благодаря уникальным свойствам хитозана, связанным с его экологической чистотой, высокой биологической активностью, реакционной способностью, биосовместимостью и биоразлагаемостью [1, 2]. Широко используются хитозан и его производные для разработки систем доставки лекарственных веществ [3, 4]. Недостатками хитозана являются его низкая растворимость в воде, неустойчивость в кислых растворах, низкая механическая прочность и плохая пластичность при использовании в виде пленок. Одним из самых эффективных методов, применяемых, чтобы улучшить физико-химические свойства хитозана, является получение его сополимеров [5, 6]. Получение сополимеров различной структуры и состава, в свою очередь, открывает возможности создания «умных» материалов (smart materials), способных изменять свойства при воздействии температуры, света, pH среды и других внешних факторов. Такие материалы привлекательны для применения при дизайне систем с контролируемым высвобождением биологически активного вещества в раствор [7].

На рис. 1 представлены структурные формулы хитозана и акриламида. Хитозан имеет вторичные и первичные гидроксильные группы, а также аминогруппы, которые способны образовывать связи с функциональными группами акриламида с образованием сополимера.

Существуют различные методы сополимеризации. Соплимеры хитозана с акриламидом могут быть получены микроволновым синтезом [8]. В работе [9] привитые сополимеры хитозана с акриламидом получены в уксуснокислых растворах хитозана с использованием в качестве инициатора персульфата аммония (ПСА). Недостатком данного метода является разрушение цепей полисахарида под влиянием ПСА [10]. Известны также способы получения привитых сополимеров хитозана с акриламидом с использованием других инициаторов радикальной полимеризации окислительной природы, в том числе ионов тяжелых металлов, например ионов церия [11] или железа [12]. Эти способы не являются желательными при получении полимеров биологического назначения.

Недостатками классических методов получения являются неоднородность протекания процессов вследствие наличия диффузионных затруднений при действии иницирующего агента, длительность процессов, необходимость нагрева и последующего извлечения из продукта остатков инициаторов полимеризации и продуктов их превращений. Альтернативным способом является сополимеризация под действием ионизирующего излучения. Данный способ позволяет не использовать химических инициаторов и проводить равномерную обработку реакционных смесей без их нагрева [13, 14].

Известно, что бетулин, как и многие его производные, обладает плохой растворимостью в воде, что снижает его биодоступность. Для улучшения растворимости и скорости растворе-

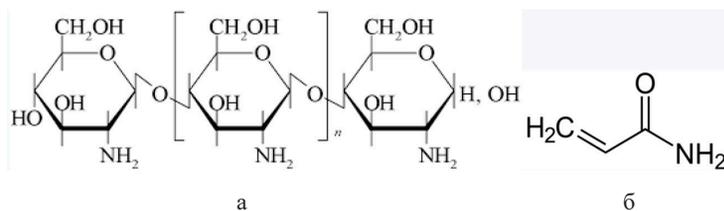


Рис. 1. Молекулярные структуры хитозана (а) и акриламида (б)

Fig. 1. Molecular structures of chitosan (a) and acrylamide (b)

ния бетулина и его производных используют различные методы, в том числе приготовление твердых дисперсий с водорастворимыми и нерастворимыми полимерами [15, 16]. При разработке систем доставки лекарственных веществ (ЛВ) особый интерес представляет получение композитов с контролируемым выделением ЛВ в раствор.

Целью данной работы являлось получение композитов бетулина с сополимерами хитозана с контролируемым выделением бетулина в раствор. Для этих целей получали привитые сополимеры хитозана с акриламидом. В качестве способа получения использовали радиационно-термический метод прививочной полимеризации.

Экспериментальная часть

Материалы

В работе использовали хитозан (ООО «Биопрогресс», Московская обл., Щелково) с $M_w = 1600$, $D = 1,05$ и степенью деацетилирования 80–82 %, полученный из панцирей крабов. Данный хитозан является низкомолекулярным и считается водорастворимым. Акриламид («Акриламид для электрофореза» 4-кратной кристаллизации, Диаэм, Россия) был использован без предварительной очистки и сушки. Бетулин был выделен из бересты березы в Институте химии и химической технологии СО РАН (Красноярск, Россия) [17]. Бетулин очищали перекристаллизацией из этанола с последующей сушкой на воздухе. Полученный продукт представлял собой полугидрат бетулина [18]. Содержание лупеола в продукте не превышало 1,5–2,5 мас. %.

Приготовление привитых сополимеров хитозана радиационно-термическим методом

Для получения привитых сополимеров хитозана с акриламидом 4 г хитозана растворяли в 200 мл 2 %-ного раствора уксусной кислоты при перемешивании до получения однородного прозрачного раствора. Далее порциями добавляли 3,5 г акриламида (соотношение 1: 2 (моль)), после чего перемешивали ещё в течение 30 мин.

Электронно-лучевую обработку растворов проводили при толщине слоя не более 1 см. Образцы перемещали со скоростью 2 см/с под выпускным окном импульсного ускорителя электронов ИЛУ-6 (ИЯФ СО РАН, Россия). Энергия электронов – 2,4 МэВ, импульсный ток пучка – 328 мА, частота следования импульсов – 2–2,5 Гц. Дозы обработки составляли 6, 12, 20, 40, 80 и 160 кГр (Дж/г).

Для выделения привитого сополимера к 1 объёму раствора добавляли 3 объема ацетона, что приводило к образованию творожистого осадка. Отделение осадка от раствора производили с помощью центрифуги ОПН-8 (Дастан, Киргизия) в течение 15 мин со скоростью 8000 об/мин ($g \sim 6400$). После отделения осадка он подвергался сушке при комнатной температуре и пониженном давлении в течение 24 часов. Затем осадок промывали 3 раза смесью ацетон – вода 60: 40 (об.). Финальную сушку проводили при 60 °С при пониженном давлении в течение 24 часов. Степень прививки определяли по приращению массы образца относительно количества исходного акриламида. Выход продукта определялся как отношение массы выделенного продукта к суммарной массе исходных реагентов.

Исследование растворимости полученных сополимеров хитозана с акриламидом в воде

1 г сополимера помещали в 100 мл воды и перемешивали с использованием магнитной мешалки, после чего пробы фильтровали через предварительно взвешенные бумажные фильтры. Фильтры высушивали при пониженном давлении и температуре 60 °С до постоянного веса.

Приготовление композитов бетулина с привитыми сополимерами хитозана с акриламидом

Смеси бетулина с сополимером хитозана с акриламидом в соотношении 1:9 (по массе) подвергали обработке в мельнице SPEX 8000 (CertiPrep Inc., США). Использовали стальной барабан емкостью 60 мл и стальные шары диаметром 6 мм. Соотношение массы образца к массе шаров составляло 1:40, ускорение шаров – 8–10 g. Время обработки – 15 мин.

Методы исследования образцов

ИК-спектроскопические исследования проводили с использованием Фурье-спектрометра Инфралюм ФТ-801 (Люмекс, Россия) в таблетках с KBr (1: 200).

Молекулярно-массовое распределение (ММР) образцов определяли методом гелепроникающей хроматографии (ГПХ) на хроматографе Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) с рефрактометрическим детектором 1260 Infinity (30 °С, PLaquagel-ОН 40, 300×7.5 мм, 0.1 М LiNO₃, 1 мл/мин). Для анализа использовали растворы с концентрацией 0,2 %.

Растворение механокомпозитов бетулина исследовали с помощью тестера растворимости Varian 705 DS (США). Для экспериментов отбирали фракцию композитов с размерами частиц 125–315 мкм. Навеску образца, содержащую бетулин в количестве, превышающем количество, необходимое для достижения насыщенного раствора, помещали в термостатированный при 37±0.5°С стеклянный стакан, снабженный механической мешалкой. Объем раствора 200 мл. Растворение проводили в буферных растворах с pH кислой среды (pH₀ = 4,7), щелочной (pH₀ = 8,51), а также с pH, близким к среде желудка (pH₀ = 1,98). Для приготовления буферных растворов использовали стандарт-титры ГОСТ 8.135–2004 (ЭКРОС, Россия). Через определённые промежутки времени производили отбор проб по 20 мл (объём раствора при этом не компенсировался). Раствор фильтровали через фильтровальную бумагу (синяя лента), фильтраты экстрагировали гексаном 3 раза, и после выпаривания остаток растворяли в этаноле. Содержание бетулина в этанольных растворах определяли методом ВЭЖХ [15].

Результаты и обсуждение

Получение сополимеров хитозана с акриламидом при облучении ускоренными электронами

В табл. 1 приведены данные о степени протекания реакции синтеза сополимера хитозана с акриламидом и растворимости полученного продукта в зависимости от дозы электронно-лучевой обработки.

Из приведённых данных видно, что степень прививки и выход продукта увеличиваются с ростом дозы ионизирующего излучения и падают, когда доза достигает 160 кГр. Высокий вы-

Таблица 1. Степень прививки, выход продукта и доля растворенного в воде вещества при различных дозах электронно-лучевой обработки

Table 1. The degree of inoculation, the yield of the product and the proportion of the substance dissolved in water at different doses of electron beam treatment

Доза, кГр	Степень прививки,%	Выход продукта,%	Растворимость,%
6	15	59	93
12	48	76	96
20	69	90	93
40	73	92	59
80	77	95	43
160	43	77	32

ход продукта наблюдается при дозах облучения 20–80 кГр. Растворимость полученного продукта в воде практически полная при дозах обработки до 20 кГр. Применение более высоких доз обработки приводит сначала к снижению доли растворенного в воде вещества вследствие сшивки и образования гелей, а далее к деструкции сополимера, проявляющейся в снижении степени прививки и выхода продукта.

На рис. 2 представлены ИК-спектры исходного хитозана и смесей хитозана с акриламидом после обработки дозами ионизирующего облучения 20 и 160 кГр. В ИК-спектрах облученных смесей присутствует полоса поглощения при 1677 см^{-1} , соответствующая колебаниям $\text{C}=\text{O}$ акриламида (полоса амид I), и исчезают колебания связи $\text{C}=\text{C}$, которые проявляются в акриламиде в области $990\text{--}900\text{ см}^{-1}$ в виде дублета. Это свидетельствует о протекании сополимеризации при облучении. Наблюдается сдвиг в область низких частот широкой полосы хитозана при $3700\text{--}3300\text{ см}^{-1}$. Это свидетельствует о том, что OH и NH группы хитозана участвуют в образовании связей с акриламидом.

Следует отметить, что ИК-спектры сополимеров с разной дозой облучения – 20 и 160 кГр – практически совпадают, что говорит о том, что радиационно-термический метод может быть использован для получения сополимеров хитозана с акриламидом и при малой дозе облучения.

На рис. 3 приведены гель-хроматограммы сополимеров хитозана и акриламида в сравнении с исходным хитозаном.

Исходный хитозан представляет собой олигомер с $M_w \sim 1600\text{ Да}$ ($n=10$). После обработки реакционных смесей ионизирующим излучением на хроматограммах появляются компоненты с меньшими временами удерживания и молекулярными массами порядка 100 кДа. В образцах, полученных при малых дозах обработки (до 20 кГр), сохраняется довольно значительное количество исходного хитозана. Наличие хитозана, не подвергшегося изменениям, может быть связано с возможностью существования в растворах надмолекулярной организации хитозана, что ранее отмечалось для его растворов в уксусной кислоте [19]. Структурированию хитозана способствуют, по-видимому, низкая молекулярная масса полимера и узкое ММР. В свою очередь, растворимость образцов, содержащих исходный хитозан, можно объяснить образованием при растворении межмолекулярных комплексов непрореагировавшего хитозана с его модифицированной частью.

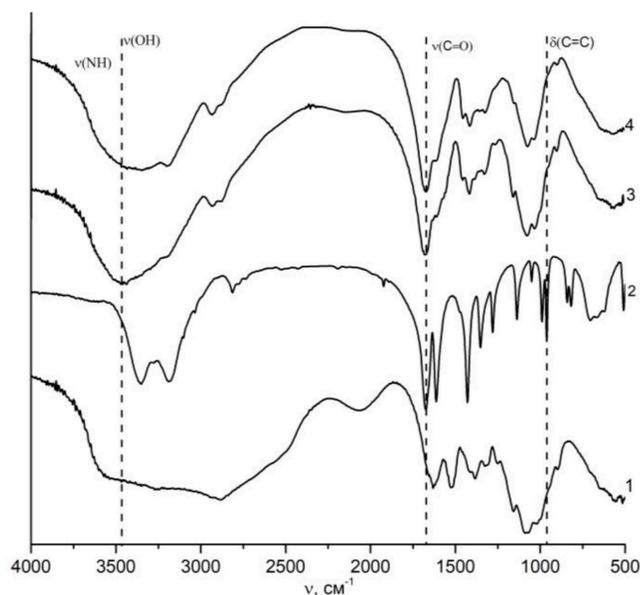


Рис. 2. ИК-спектры исходного хитозана (1), акриламида (2) и сополимеров, полученных при облучении смесей хитозана с акриламидом при дозе ионизирующего облучения 20 (3) и 160 (4) кГр

Fig. 2. IR spectra of initial chitosan (1), acrylamide (2), and copolymers obtained under irradiation with electrons at 20 (3) and 160 (4) kGy

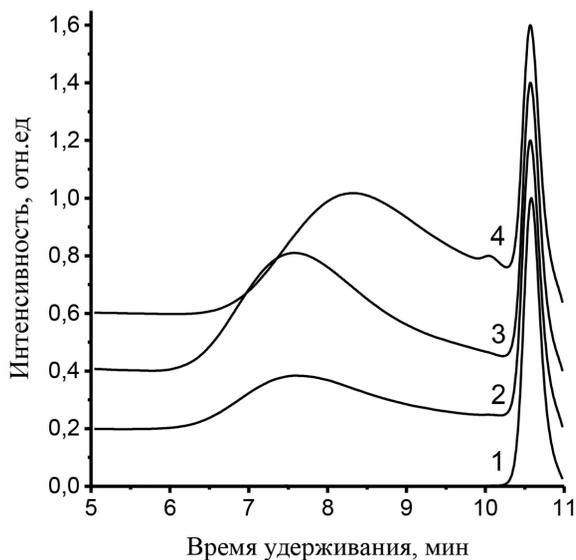


Рис. 3. Гель-хроматограммы хитозана (1) и сополимеров хитозана и акриламида, полученных при дозах электронно-лучевой обработки 6 (2), 12 (3) и 20 (4) кГр

Fig. 3. Gel chromatograms of chitosan (1) and copolymers of chitosan and acrylamide obtained at doses of electron beam treatment of 6 (2), 12 (3), and 20 (4) kGy

*Получение композитов бетулина
с сополимером хитозана механохимическим методом
и исследование их растворения*

Для получения композита с бетулином был взят сополимер, полученный при максимальной использованной в данной работе дозе облучения, характеризующийся низкой степенью прививки, с тем чтобы выяснить, как проявляется влияние сополимеризации в этом случае. Композит бетулина с сополимером хитозана с акриламидом (доза облучения 160 кГр) был получен с помощью механохимической обработки смеси исходных компонентов в молярном соотношении 1:9 (бетулин: сополимер).

Исследование методом ИК-спектроскопии (рис. 4) показало, что в спектре механически обработанной смеси бетулин – сополимер в сравнении с физической смесью компонентов наблюдается сдвиг валентных колебаний О-Н ($3600\text{--}3300\text{ см}^{-1}$) бетулина в область низких частот. Это указывает на то, что в результате механической обработки образуются более сильные водородные связи. Таким образом, при механической обработке, по-видимому, происходит межмолекулярное взаимодействие гидроксильной группы бетулина с аминогруппой сополимера с образованием композита.

На рис. 5 приведены кривые растворения бетулина из композитов с сополимером хитозана при различных рН раствора. Видно, что наибольшая скорость растворения наблюдается в щелочной среде с рН 8,5. Таким образом, полученные сополимеры хитозана с акриламидом

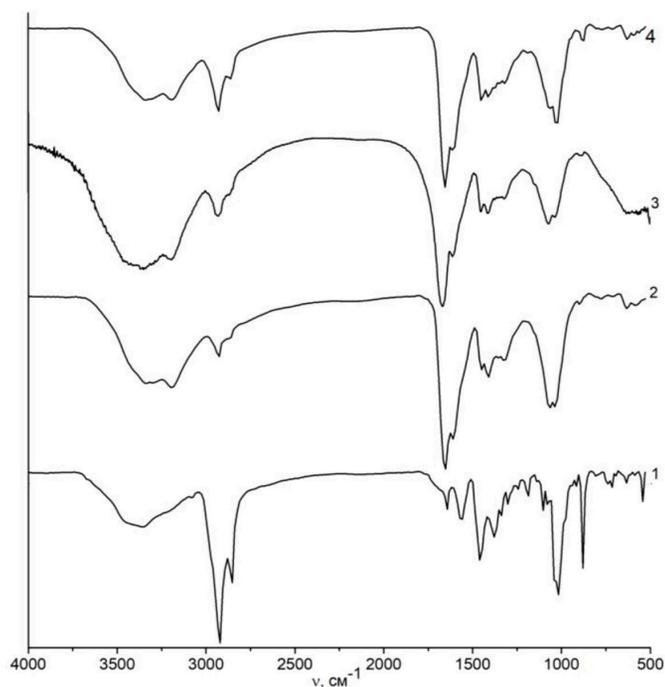


Рис. 4. ИК-спектры бетулина (1), сополимера хитозана с акриламидом (2), физической смеси бетулина с сополимером (3) и смеси бетулина с сополимером хитозана после механической обработки (4)

Fig. 4. IR spectra of betulin (1), chitosan copolymer with acrylamide (2), physical mixture of betulin with a copolymer (3), and mixture of betulin with chitosan copolymer after mechanical treatment (4)

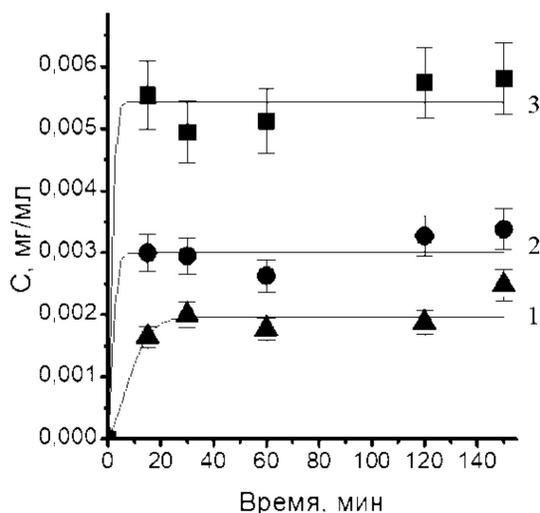


Рис. 5. Кривые выделения бетулина из композитов с сополимером хитозана в водных растворах с различным рН: 2,2 (1); 4,9 (2); 8,5 (3)

Fig. 5. Release of betulin from the composites with chitosan copolymer in aqueous solutions with different pH: 2.2 (1), 4.9 (2), 8.5 (3)

представляют собой «умные материалы», способные выделять в раствор лекарственные вещества с различной скоростью в зависимости от рН раствора. Наблюдаемый эффект может быть связан с ослаблением межмолекулярных связей в композите в щелочной среде и может стать предметом дальнейших исследований.

Представляет интерес сравнить полученные кривые с растворимостью композитов бетулина с другими полимерами. Так, при растворении механокомпозита бетулина с полиэтиленгликолем [20] наблюдается высокая скорость выделения бетулина в раствор в первые 30 мин растворения, но затем его концентрация в растворе снижается в результате кристаллизации вещества из раствора. В отличие от этого в случае композитов с сополимером хитозана высокая концентрация в растворе сохраняется длительное время, что связано, по-видимому, с наличием межмолекулярных комплексов в растворе.

Заключение

Радиационно-термическим методом с использованием ускоренных электронов получены привитые сополимеры хитозана с акриламидом. Образование привитых сополимеров подтверждено методами ИК-спектроскопии и гель-проникающей хроматографии. Показано, что эффективность синтеза и степень прививки зависят от дозы ионизирующего облучения, и с ростом дозы проходят через максимум. Высокий выход продукта наблюдается при дозах облучения 20–80 кГр. Полученные сополимеры использованы для получения композитов бетулина с помощью механохимической обработки. Показано, что скорость выделения бетулина в водный раствор при растворении механокомпозита зависит от рН раствора, что позволяет рассматривать механокомпозиты на основе сополимеров хитозана с акриламидом как перспективные средства для контролируемой доставки бетулина, а также других лекарственных веществ.

Список литературы / References

1. Khajavian M., Vatanpour V., Castro-Munoz R., Boczkaj G. Chitin and derivative chitosan-based structures-preparation strategies aided by deep eutectic solvents: A review. *Carbohydrate Polymers* 2022. 275, Art. 118702.
2. Bakshi P.S., Selvakumar D., Kadirvelu K., Kumar N.S. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *Intern. J. Biological Macromolecules* 2020. 150, 1072–1083.
3. Sivanesan I., Gopal J., Muthu M., Shin J., Mari S., Oh J. Green synthesized chitosan/chitosan nanoforms/nanocomposites for drug delivery applications. *Polymers* 2021. 13(14), Art. 2256.
4. Pari R. Drug delivery applications of chitin and chitosan: a review. *Environmental Chemistry Letters* 2020. 18(3), 577–594.
5. Kumar D., Gihar S., Shrivash M.K., Kumar P., Kundu P.P. A review on the synthesis of graft copolymers of chitosan and their potential applications. *Intern. J. Biological Macromolecules* 2020. 163, 2097–2112.
6. Boominathan T., Sivaramakrishna A. Recent advances in the synthesis, properties, and applications of modified chitosan derivatives: Challenges and opportunities. *Topics in Current Chemistry* 2021. 379(3), Art. 19.
7. Smart Materials for Drug Delivery: Complete Set // Ed. by Angel Concheiro and Carmen Alvarez-Lorenzo. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013. 900.
8. Desnelli D., Eliza E., Mara A., Rachmat A. Synthesis of copolymer of chitosan with acrylamide as an adsorbent for heavy metal waste treatment. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 2020. 833. Art. 012064.
9. Мочалова А.Е., Заборщикова Н.В., Князев А.А., Смирнова Л.А., Извозчикова В.А., Медведева В.В., Семчиков Ю.Д. Привитая полимеризация акриламида на хитозан: структура и свойства сополимеров. *Высокомолекулярные соединения* 2006. 48(9), 1588–1594. [Mochalova A.E., Zaborshchikova N.V., Knyazev A.A., Smirnova L.A., Izvozchikova V.A., Medvedeva V.V., Semchikov Yu.D. Graft polymerization of acrylamide on chitosan: Copolymer structure and properties. *Polymer Science, Series A* 2006. 48(9), 918–923].
10. Татаринов П.В., Мочалова А.Е., Бельшева Е.В., Смирнова Л.А., Бодриков И.В. Индуцированная деградация хитозана, сопряженная с блок-сополимеризацией с акриламидом. *Журнал прикладной химии* 2010. 83(7), 1188–1192. [Tatarinov P.V., Mochalova A.E., Belysheva I.V., Smirnova L.A., Bodrikov I.V. Induced degradation of chitosan, conjugated with block copolymerization with acrylamide. *Russian Journal of Applied Chemistry* 2010. 83(7), 1294–1298].
11. Okieimen F.E. Preparation, characterization, and properties of cellulose-polyacrylamide graft copolymers. *Journal of Applied Polymer Science* 2003. 89(4), 913–923. Doi: 10.1002/app.12014.
12. Aihua Shi, Xiangyi Dai, Zhaxin Jing. Tough and self-healing chitosan/poly(acrylamide-co-acrylic acid) double network hydrogels. *Polymer Science, Series A* 2020. 62(3), 228–239.
13. Hui Sun, Anders Wirsén, Ann-Christine Albertsson. Electron beam-induced graft polymerization of acrylic acid and immobilization of arginine–glycine–aspartic acid-containing peptide onto nanopatterned polycaprolactone. *Biomacromolecules* 2004. 5(6), 2275–2280. Doi: 10.1021/bm049703p.

14. Пономарев А. В. Радиоллиз как мощное средство для переработки полимерных отходов. *Химия высоких энергий* 2020. 54(3), 211–222. [Ponomarev A. V. Radiolysis as a powerful tool for polymer waste recycling. *High Energy Chemistry* 2020. 54(3), 194–204].
15. Myz S. A., Shakhtshneider T. P., Mikhailenko M. A., Ogienko A. G., Bogdanova E. G., Ogienko A. A., Kuznetsova S. A., Boldyreva E. V., Boldyrev V. V. Ultrafine betulin formulation with biocompatible carriers exhibiting improved dissolution rate. *Natural Product Communications* 2015. 10(8), 1345–1347.
16. Мальяр Ю. Н., Кузнецова С. А., Шахтшнейдер Т. П., Михайленко М. А., Чесноков Н. В. Получение композитов диацетата и дипропионата бетулина с аэросилом. *Журнал Сибирского федерального университета. Химия* 2015. 2(8), 277–286. [Malyar Yu. N., Kuznetsova S. A., Shakhtshneider T. P., Mikhailenko M. A., Chesnokov N. V. Obtaining composites of betulin diacetate and dipropionate with aerosil. *Journal of Siberian Federal University: Chemistry* 2015. 2(8), 277–286. (In Russ.)].
17. Патент 2264411 РФ. Кузнецова С. А., Кузнецов Б. Н., Михайлов А. Г., Левданский В. А. Способ получения бетулина. Оpubл. 20.11.2005. [Patent 2264411 RU. Kuznetsova S. A., Kuznetsov B. N., Mikhailov A. G., Levdanskiy V. A. Method of production of betulin. Publ. Date 20.11.2005 (In Russ.)].
18. Дребущак Т. Н., Михайловская А. В., Дребущак В. А., Михайленко М. А., Мызь С. А., Шахтшнейдер Т. П., Кузнецова С. А. Кристаллические формы бетулина. Полиморфизм или псевдополиморфизм? *Журнал структурной химии*. 2020. 8, 1328–1334 [Drebushchak T. N., Mikhailovskaya A. V., Drebushchak V. A., Mikhailenko M. A., Myz S. A., Shakhtshneider T. P., Kuznetsova S. A. Crystal forms of betulin. Polymorphism or pseudopolymorphism? *Journal of Structural Chemistry* 2020. 8, 1260–1266].
19. Vikhoreva G. A., Pchelko O. M., Gal'braikh L. S., Rogovina S. Z. The phase state and rheological properties of the chitosan-acetic acid-water system. *Polymer Science, Ser. B* 2001. 43(6), 1079–1084.
20. Myz S. A., Mikhailovskaya A. V., Mikhailenko M. A., Bulina N. V., Kuznetsova S. A., Shakhtshneider T. P. New crystalline betulin-based materials: improving betulin solubility via cocrystal formation. *Materials Today: Proceedings* 2019. 12(P1), 82–85.