

Актуальные аспекты и специфика стандартизации полного аллергенного экстракта пыльцы берёзы

© Смирнов^{1*+} Валерий Валерьевич, Боков¹ Дмитрий Олегович,
Морохина² Светлана Львовна и Луферов³ Александр Николаевич

¹ Кафедра фармацевтической и токсикологической химии. Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова. Никитинский бульвар, 13. г. Москва, 119019. Россия.
Тел.: (925) 358-84-27. E-mail: fmmsu@mail.ru.

² Кафедра фармакогнозии. Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова. Нахимовский пр., 45. г. Москва, 117418. Россия.
Тел.: (916) 150-60-58. E-mail: morohinas@mail.ru

³ Кафедра ботаники. Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова. Измайловский бульвар, д.8, стр. 1. г. Москва, 105043. Россия.
Тел.: (499) 367-17-36. E-mail: lufervc@mail.ru

*Ведущий направление; +Поддерживающий переписку

Ключевые слова: стандартизация, аллергенные экстракты, пыльца, берёза повислая, *Betula pendula* Roth., *Betv1*, ВЭЖХ-МС.

Аннотация

В работе представлены результаты исследования белковой фракции полного экстракта пыльцы берёзы повислой (*Betula pendula* Roth.), рода *Betula* L., (сем. Берёзовые – *Betulaceae* S.F. Gray). Проведённые исследования позволили разработать методику определения мажорного белка *Betv1* в экстракте с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с хромато-масс-спектрометрическим детектированием. Определены показатели фрагментации основного иона мажорного белка *Betv1*: $m/z = 876.1$. Проведён анализ нативного сырья – пыльцы берёзы – по показателям подлинности и доброкачественности, идентифицированы основные анатомо-диагностические характеристики. Комплексный анализ, как сырья, так и полученного экстракта позволяют рекомендовать полученные данные при создании проекта фармакопейной статьи на аллергенный экстракт пыльцы берёзы, применяющийся при проведении аллерген-специфической иммунотерапии.

Введение

Во всём мире произрастает примерно больше 140 видов берёз (сем. Берёзовые – *Betulaceae* S.F. Gray, род *Betula* L.), на территории России из них представлено порядка 70. В общей сложности березняки покрывают площадь около 100 млн. км². К наиболее распространённым видам относятся: берёза повислая *Betula pendula* Roth. (syn.: берёза бородавчатая – *Betula verrucosa* Ehrh.), берёза пушистая (или берёза белая) – *Betula pubescens* Ehrh. (*Betula alba* L.), берёза плосколистная – *Betula platyphylla* Sukacz (рис. 1). Растения широко используются в медицине [1], из них производят ряд препаратов [2].

Ареал указанного рода отличается чрезвычайной обширностью, представители распространены практически по всему миру, за исключением Африки и Австралии. Берёза повислая занимает зону лесов Европейской части России, в Сибири, на Кавказе и Алтае, а также во всех странах Европы, за исключением Пиренейского полуострова.

В Карелии так же встречается особая разновидность берёзы повислой – карельская берёза (*Betula pendula* var. *carelica*). Берёза пушистая отличается от берёзы повислой прежде всего наличием опушения у молодых побегов, более плотными кожистыми листьями овально-яйцевидной формы, несколько менее длинными ветвями, направленными вверх и в стороны, так же старые деревья у основания ствола имеют кору белого цвета.

В природе зачастую происходит гибридизация данных видов. Отличие берёзы плосколистной от указанных видов состоит в следующем: треугольно-яйцевидной форме листовой пластинки с усеченным основанием, а также прицветными чешуйками с длинным клиновидным

Полная исследовательская публикация __ Смирнов В.В., Боков Д.О., Морохина С.Л. и Луферов А.Н. основанием. Берёза плосколистная произрастает в гораздо более суровых климатических условиях, она распространена в Якутии, Восточной Сибири, Забайкалье и Дальнем Востоке [3] (рис. 2).

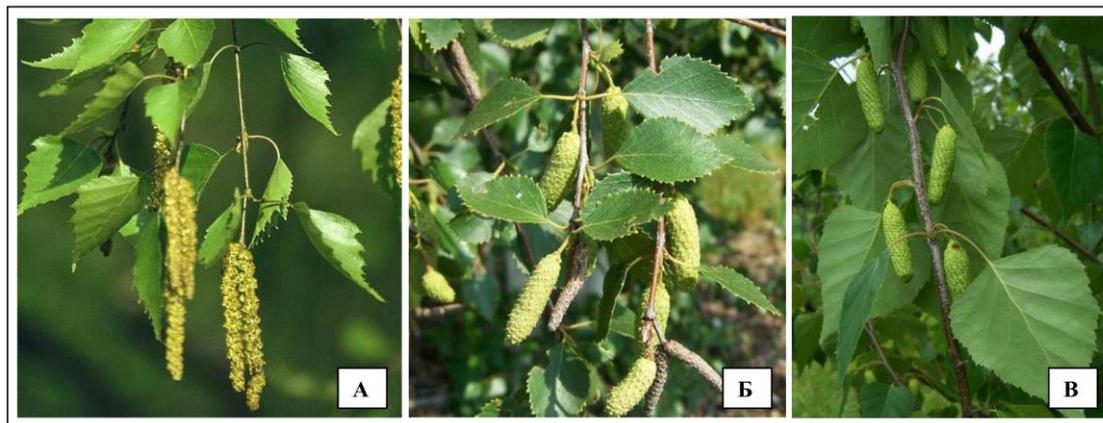


Рис. 1. Основные представители рода *Betula* L.: А – берёза повислая *Betula pendula* Roth.; Б – берёза пушистая *Betula pubescens* Ehrh.; В – берёза плосколистная – *Betula platyphylla* Sukacz

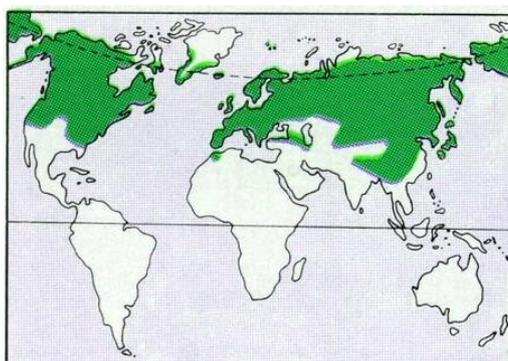


Рис. 2. Ареал представителей рода *Betula* L. только из одного цветка [1]. Иллюстрации ветвей с тычиночными серёжками представлены на рис. 3.

Аллергены, находящиеся в пыльцевых зёрнах берёзы, являются одними из наиболее активных в составе пыльцевого спектра деревьев, в этом плане самой «аллергенной» оказалась пыльца берёзы повислой [4].

Для этого дерева характерна достаточно мощная, неглубокая корневая система, пыльцевые зёрна имеют многоугольную форму.

Берёза повислая зацветает ранней весной (апрель-май), выбрасывая в атмосферный воздух огромные количества пыльцы. Так, она способна образовывать порядка 6 млн. зёрен пыльцы



Рис. 3. Мужские соцветия берёзы повислой *Betula pendula* Roth.: А – общий вид; Б – молодые соцветия с пыльцевыми зёрнами; В – раскрывшиеся соцветия

В составе пыльцы берёзы повислой содержатся комплекс липидов, белки (около 50), аминокислоты, минеральные соли, микро- и макроэлементы (Fe, Cu, K, P, Mn) витамины группы А, В₁, В₆, Е, Р, К, аскорбиновая кислота, фолиевая кислота. Следует отметить, что витаминов в пыльце содержится значительно больше, нежели в иных частях.

Пыльца эффективна в качестве миелостимулирующего средства, часто находит применение для терапии заболеваний сердечно-сосудистой, эндокринной, нервной систем [1]. К сожалению, зачастую пыльца вызывает аллергические реакции, которые обусловлены белковым составом (в основном гликопротеинами) самой пыльцы. Наиболее выраженными аллергенными свойствами обладают компоненты экины, рибосом, митохондрий, входящих в состав пыльцевого зерна [5].

По данным специалистов, порядка 8 белковых молекул обладает выраженной аллергенной активностью. Данные белки имеют молекулярную массу порядка 17-40 кД. Согласно аллергенной номенклатуре регистрацию прошли: Betv (1-7) [4], характеристика основных аллергенных белков представлена в табл. 1.

Следует особо отметить, что мажорным (главным) аллергенным белком, на который приходится до 95% всей аллергенной специфической активности, является белок Betv1 (рис. 4), входящий в суперсемейство PR-10 (Pathogenesis related protein), гликопротеин по строению (20% углеводных остатков) с молекулярной массой 17 кД [6]. Так же аллергенной активностью обладает белок Betv2, профилин с молекулярной массой 15 кД.

Табл. 1. Основные аллергенные белки, входящие в состав экстракта пыльцы берёзы *Betula pendula* Roth

Название аллергенного белка	Группа по классификации	Функция, выполняемая в организме	Молекулярная масса (кДа)
Betv1	PR-10 protein	Патогенреактивный протеин	17
Betv2	Профилин	Актин-связывающий протеин	15
Betv3	4 EF-кальций связывающий белок	Кальций-связывающий протеин	23
Betv4	2-EF-кальций связывающий белок, полькальцин	Кальций-связывающий протеин	8
Betv6	Изофлавоновая редуктаза	Изофлавоновая редуктаза	34
Betv7	Циклофилин	Пептидилпролил изомераза	18

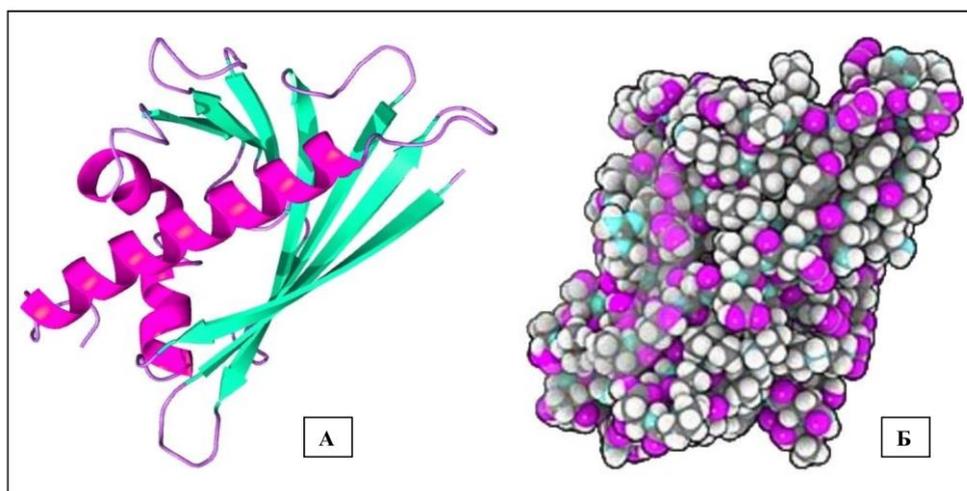


Рис. 4. А, Б – Модели четвертичной структуры молекулы белка Betv1 [7]

Аллергены пыльцы берёзы становятся причиной развития поллинозов, или пыльцевых аллергий, (от лат. *pollen* – пыльца), которые представляют собой хронические сезонные воспалительные аллергические заболевания. Клинически подобные заболевания проявляются в виде сезонных аллергических конъюнктивитов и ринитов, которые часто сопровождаются развитием осложнений.

Согласно данным многочисленных эпидемиологических исследований, проводимых в разных странах, прослеживается четкая тенденция к увеличению распространенности поллинозов, как среди взрослого населения, так и среди детей [8].

Среди великого множества терапевтических вмешательств, которые может предоставить клиническая практика для лечения аллергических заболеваний, аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) всегда занимала особое место и с успехом предлагается в качестве метода, отвечающего всем требованиям современной медицины с точки зрения достижения оптимальных результатов терапии [9].

Полная исследовательская публикация __ Смирнов В.В., Боков Д.О., Морохина С.Л. и Луферов А.Н.

Для проведения АСИГ чаще всего используются так называемые водно-солевые экстракты аллергенов, ответственных за возникновение заболевания, а также аналогичные биологические препараты [10].

Поскольку лечебные и диагностические аллергены изготавливаются из натурального сырья, в частности сбор пыльцы берёзы проводится в естественных условиях, состав данных лекарственных препаратов может в значительной степени варьироваться [11].

Общим требованием к любому сырьевому материалу, в том числе пыльце берёзы – строгая видовая специфичность и её идентификация, отсутствие посторонних примесей [12].

В фармакогностическом анализе важным диагностическим признаком, при исследовании цветков, является строение пыльцевых зёрен [13].

При визуальном и микроскопическом (используемом в палинологических исследованиях) анализах в сырье разрешено установить не более 1% посторонних примесей (FDA, 21 CFR 680.1) [14].

Так на рис. 5 представлены фотографии пыльцы берёзы повислой, полученные при помощи растровой электронной микроскопии [15]. К сожалению, в повседневных лабораторных анализах зачастую возможно использование исключительно световой микроскопии для определения внешних признаков пыльцы берёзы, поступившей на анализ [16].

Таким образом, возникает необходимость в более детальном рассмотрении диагностических признаков нативного сырья пыльцы берёзы повислой, чтобы уже на первом этапе не допустить использование некондиционного сырьевого материала [17]. Поскольку подобные исследования уже проводились рядом авторов [18] в ботаническом аспекте [19], так же необходима систематизация полученного материала для нужд фармацевтической практики.

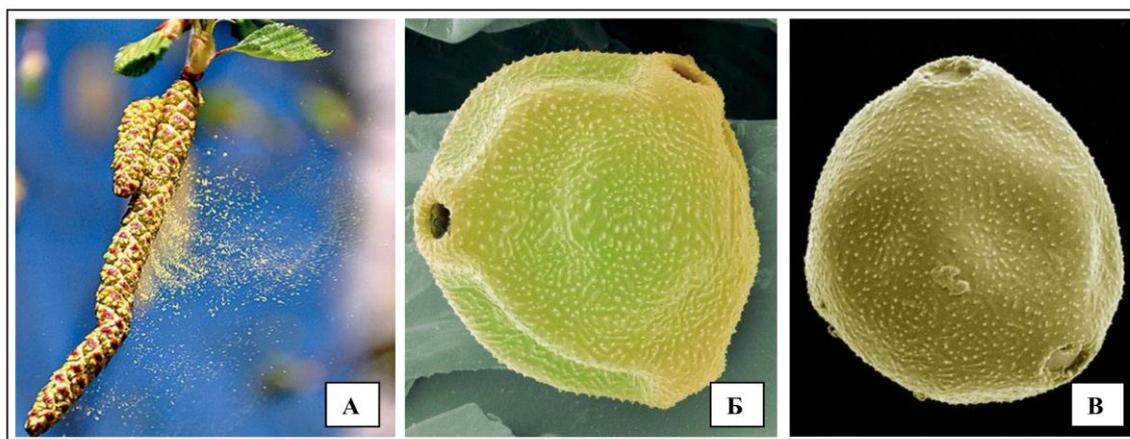


Рис. 5. А – пыльца, рассеивающаяся в атмосферном воздухе; Б, В – микрофотографии пыльцевого зерна берёзы повислой (*Betula pendula* Roth) с разных ракурсов, полученные при помощи растровой электронной микроскопии, ув. 940×

Следует учитывать, что экстракт пыльцы берёзы – это сложный по составу комплекс соединений, полученный путём дефрагментации и последующего извлечения из сырья смеси белков, который содержит определённую группу аллергенов, гликолипидов, гликопротеидов, липидную фракцию, которая затрудняет очистку при приготовлении препарата [20] и другие сопутствующие компоненты.

Для того чтобы аллергенные экстракты имели эквивалентный антигенный состав и специфическую активность, требуется процедура стандартизации. Следует отметить, что данная процедура необходима для любого нативного сырья [21], методики определения необходимого компонента могут значительно различаться [22].

Поскольку самый большой вклад в формирование аллергической реакции вносит белок Betv1, наиболее целесообразно проводить стандартизацию экстракта пыльцы берёзы повислой по этому аллергенному белку. Концентрацию белка Betv1 возможно определить методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с хроматомасс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) – High performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). Сегодня данное направление является приоритетным в области стандартизации аллергенных экстрактов [23] и лекарственных препаратов [24].

Таким образом, в цели и задачи данного исследования входили: определение оптимального параметра, относительно которого будет проводиться стандартизация аллергенного экстракта, изучения химического состава, а так же разработка и валидация методики стандартизации данного экстракта по выбранному компоненту с использованием метода ЖХ-МС.

Экспериментальная часть

Объектом исследования послужили мужские генеративные почки берёзы повислой (*Betula pendula* Roth), собранные в лесо-парковых зонах Москвы и Московской области. Сбор сырьевого материала – соцветий с пылью – осуществлялся с 25 апреля по 14 мая 2013 года с деревьев без видимых повреждений грибковыми заболеваниями и вредителями, диаметром 20-35 см. Почки собирались со свисавших ветвей на высоте около 1-3 м. Сушка воздушно-тенева, при температуре не выше 35 °С, сушеное сырье хранилось в мешочках в сухом помещении.

Исследования анатомо-морфологических признаков сырья осуществляли в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи 7-го издания (“Allergen products – Pollens”) [12]. В качестве сравнения были использованы методика Г. Эрдмана [25] с ацетоллизной обработкой и по упрощённой методике Е.И. Аветисян [26]. Было установлено, что морфологическая структура и размеры пыльцевых зерен одного и того же объекта до и после ацетоллиза достоверно не различаются, поэтому использование фармакопейной методики [27] в данном случае допустимо. Специальных методов окрашивания образцов пыльцевых зёрен не применялось.

Табл. 2. Оборудование и условия хроматографического анализа полного экстракта пыльцы берёзы повислой (*Betula pendula* Roth)

Наименование	Характеристика
Хроматограф	Жидкостной хроматограф SHIMADZU (Japan)
Детектор	Тандемный масс-селективный детектор (Japan)
Пробоподготовка	Точную навеску 10 мг экстракта помещали в мерную колбу объемом 100 мл, растворяли в воде деионизированной и доводили объем до метки. 2 мл полученного раствора пропускали через фильтр с размером пор 0.4 мкм. Фильтрат помещали во флакон для хроматографирования объемом 2 мл
<i>Хроматографические условия</i>	
Колонка	Колонка: Agilent XDB-C18, 4.6x150 мм; 5.0 мкм
Подвижная фаза	Смесь 0.1 % раствора муравьиной кислоты в воде с ацетонитрилом (55:45)
Система водоподготовки	Millipore, Milli-Q Advantage A10 (France)
Температура колонки	30 °С
Скорость потока	0.3 мл/мин
Объем вводимой пробы	Объем вводимой пробы составлял 10 мкл
<i>Масс-спектрометрические условия</i>	
Параметры источника ионизации:	
Тип ионизации	Сдвоенная система ионизации (DUIS): электроспрей (ESI) и химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)
Режим	Product ion mode в положительной полярности. Q ₁ в SIM режиме при m/z = 876.1
Энергия ионизации в калюзионной ячейке	-35 В
Режим Q ₃	SCAN с диапазоном m/z от 123.2-876.1
Программное обеспечение	Программный комплекс Analyst 1.5 для Windows
Метод расчета	Метод абсолютной калибровки
Вспомогательное оборудование	Весы аналитические Precisa Gravimetrics, AG Switzerland; центрифуга Eppendorf, 5415D Germany; встряхиватель типа вортекс, ELMi Latvia; концентратор Eppendorf, Concentrator plus Germany; рН-метр Mettler Toledo, FE20 Switzerland; дозаторы переменного объема Eppendorf, 10-100 мкл и 100-1000 мкл Germany; фильтры 0.4 мкм

Исследования и фотоснимки выполнялись с использованием микроскопа *Альтами 139Т* (окуляр 10× и объективы: 4×, 10×, 40×, 100×) с помощью цифровой окулярной камеры *UCMOS05100KPA*; снимки обрабатывались с использованием программы *Altami Studio* [28].

Полный экстракт пыльцы берёзы получали стандартным способом для аллергенных экстрактов, где в качестве сырья используется пыльца растений, по методу Кока (1922) [29]. Характеристика оборудования и условий хроматографического анализа полного экстракта из пыльцы берёзы повислой представлены в табл. 2.

Методика проведения анализа включала следующие этапы: подготовку хроматографической системы к анализу, пробоподготовки объектов исследования (табл. 2), приготовление подвижной фазы (табл. 2), и непосредственное проведение ВЭЖХ-анализа с последующим хромато-масс-селективным детектированием.

Подготовка хроматографической системы к анализу включала в себя подготовку компонентов подвижной фазы (проверку и коррекцию рН, фильтрование, при необходимости); смену компонентов

Полная исследовательская публикация __ Смирнов В.В., Боков Д.О., Морохина С.Л. и Луферов А.Н. подвижной фазы, промывку каналов подачи и насосов; уравнивание хроматографической системы: промывание колонки исходным составом подвижной фазы при включенном термостате и детекторе до тех пор, пока базовая линия не выйдет на определенный постоянный уровень (не менее 10 колоночных объемов); проверку пригодности хроматографической системы к работе: соответствие общих параметров работы прибора (давление, изменение сигнала детектора во времени, уровень шума).

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований, были установлены морфологические особенности и метрологическая характеристика пыльцевых зерен берёзы повислой (*Betula pendula* Roth), произрастающей в Москве и Московской области.

Пыльцевые зерна у данного вида обычно одиночные, бывают 3-х, реже 4-х поровые, сплюснутые радиально-симметричные, изополярные, сплюснуто-сфероидальные.

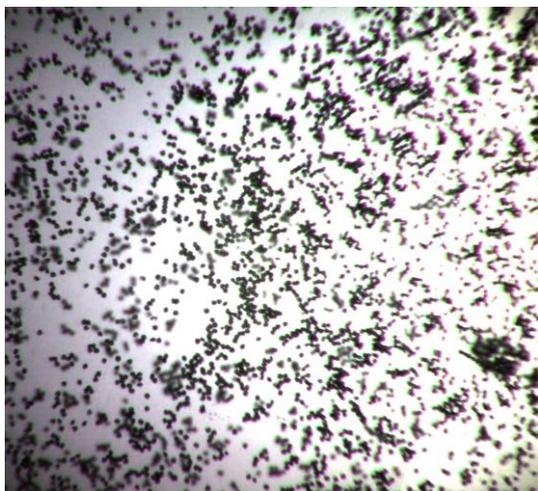


Рис. 6. Морфологическое строение пыльцевых зерен (*Betula pendula* Roth.), увеличение 40×

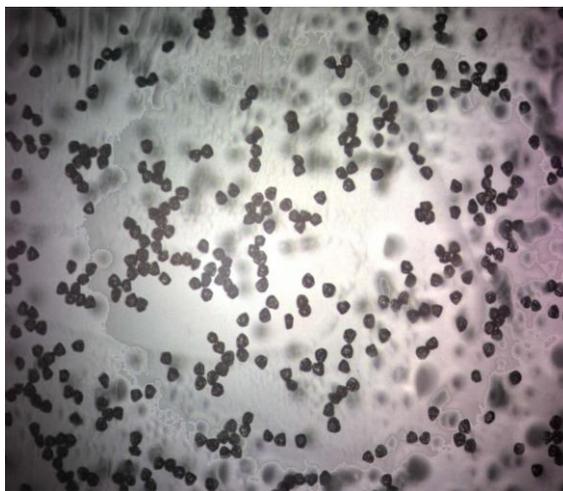


Рис. 7. Морфологическое строение пыльцевых зерен (*Betula pendula* Roth.), увеличение 100×

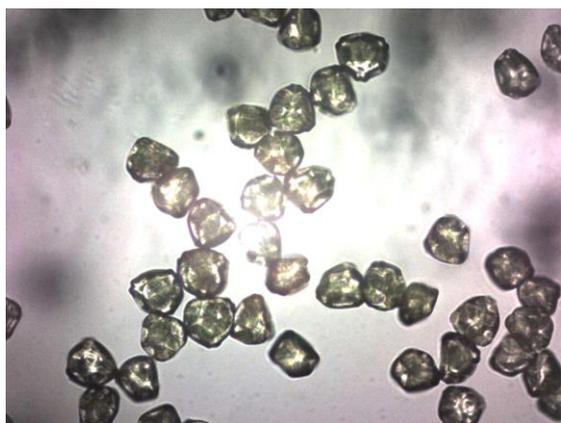


Рис. 8. Морфологическое строение пыльцевых зерен (*Betula pendula* Roth.), увеличение 400×

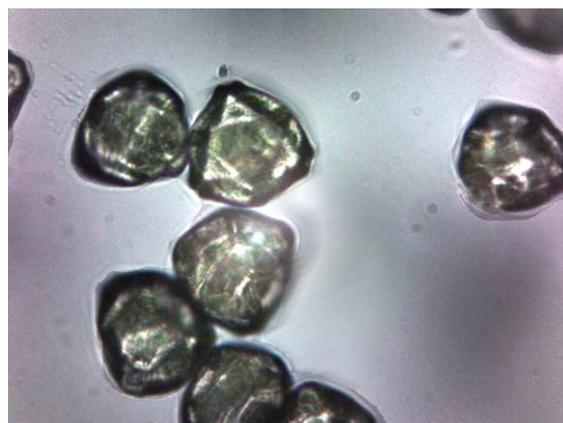


Рис. 9. Морфологическое строение пыльцевых зерен (*Betula pendula* Roth.), увеличение 1000×

Если смотреть в очертании с одного полюса, то от округло-треугольных до треугольных, а в очертании с экваториальной оси – эллиптической формы. Размер пыльцевых зёрен варьирует в диапазоне 20-35 мкм в диаметре (полярная ось 19-23 мкм, экваториальная ось 22-30 мкм), что зависит от места сбора и материнского растения, а так же от ряда других факторов (освещённость, характер почв и др.)

Что касается пор, то они по большей части расположены экваториально (зонально), имеют сложное (камерное) строение. Поры округлой или овальной формы с ободком, который немного приподнят над поверхностью пыльцевого зерна, диаметром около 2-4 мкм. Основные диагностические признаки представлены на рис. 6-9.

В ходе эксперимента по стандартизации полного экстракта пыльцы берёзы, были подобраны оптимальные условия хроматографического разделения, представленные в табл. 2,

АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ И СПЕЦИФИКА СТАНДАРТИЗАЦИИ ПОЛНОГО АЛЛЕРГЕННОГО... _____ 13-20
проведена валидация методики по показателям селективность, прецизионность, точность, линейность, предел обнаружения и предел определения. В результате была разработана чувствительная и селективная методика количественного определения белка Betv1, которая может быть использована для стандартизации экстрактов пыльцы берёзы, применяемых при проведении АСИТ. Идентификацию мажорного белка Betv1 по основному иону 876.1 и по характерной фрагментации этого иона. При масс-детектировании происходит дробление молекулы белка на фрагменты с уникальной массой (система ионизации DUIS: ESI+APCI, Q₃ в режиме SCAN с диапазоном m/z от 123.2-876.1), регистрирование которых позволяет чётко определять исходное соединение, поскольку схема фрагментации индивидуальна у каждого белковой структуры.

Заключение

В ходе данной работы были рассмотрены основные аспекты стандартизации полного экстракта пыльцы берёзы повислой (*Betula pendula* Roth.). Были определены параметры характеризующие качество самого нативного сырья и получаемого из него продукта. Данные, полученные в результате эксперимента, в значительной степени будут способствовать процессу создания соответствующей фармакопейной статьи.

Выводы

1. В ходе исследования были идентифицированы основные анатомо-диагностические признаки пыльцы берёзы повислой (*Betula pendula* Roth), произрастающей в Москве и Московской области, приведена их метрологическая характеристика: размер пыльцевых зёрен 20-35 мкм в диаметре (полярная ось 19-23 мкм, экваториальная ось 22-30 мкм), поры округлой или овальной формы с приподнятым ободком, диаметр пор 2-4 мкм.
2. Разработана универсальная методика ВЭЖХ доказательства подлинности, количественного содержания мажорного белка Betv1 в экстракте пыльцы берёзы. Методика проведения анализа состоит в том, что предварительно полученный экстракт хроматографируют на колонке *Agilent XDB-C18*, 4.6x150 мм; 5.0 мкм, в качестве подвижной фазы используется смесь 0.1 % раствора муравьиной кислоты в воде с ацетонитрилом (55:45), детектирование разделённой смеси проводится хромато-масс-спектрометрическим методом. Данная методика позволяет определить основные показатели фрагментации основного иона мажорного белка Betv1: m/z = 876.1. Результаты проведенной валидации подтверждают, что разработанная методика пригодна для контроля качества экстракта пыльцы берёзы и может быть включена в соответствующую фармакопейную статью.

Литература

- [1] Ноздрин К. В., Крутых Е. Г., Ноздрин В. И. Берёза как источник фармакологически активных веществ. [Электронный ресурс]: *Берёза – источник ФАВ. ЗАО ФНПП «Ретиноиды», Медицинский институт Орловского государственного университета*. Режим доступа: <http://vitalines.com/n56563-beryoza-kak-istochnik.html> (дата обращения: 3.07.2013).
- [2] Сосипатрова А.А., Осипов В.И., Демина Н.Б., Быков В.А. Биологически активные вещества сухого экстракта листьев берёзы: идентификация и количественное определение соединений нефенольной природы методом ГХ-МС. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2011. №7. С.15-23.
- [3] Воробьев Г.И, Анучин Н.А., Атрохин В.Г., Виноградов В.Н. Лесная энциклопедия. [Электронный ресурс]: *Под Берёза (Betula L.)*. Режим доступа: <http://dendrology.ru/forest/item/f00/s01/e0001898/index.shtml> (дата обращения: 6.07.2013).
- [4] Plant allergens. [Electronic resource]: *MedUniver*. Mode of access: <http://meduniver.com/Medical/Physiology/1544.html> (date accessed: 04.07.2013).
- [5] Передкова Е.В. Пыльцевая аллергия. *Consilium medicum*. 2009. Т.11. №3. С.63-66.
- [6] Павлов А.Е. Сейлиева Н.А., Мухортых О.Ю. Получение и оценка свойств рекомбинантного аналога мажорного аллергена пыльцы берёзы Betv1. *Российский аллергологический журнал*. 2012. №3. С.7-13.
- [7] Structural Classification of Proteins and ASTRAL release 1.75B (January 2013) [Электронный ресурс]: Classes in SCOP 1.75B <http://scop.berkeley.edu/> (date accessed: 23.07.2013).

- Полная исследовательская публикация** __ Смирнов В.В., Боков Д.О., Морохина С.Л. и Луферов А.Н.
- [8] Хаитов Р.М. Ильина Н.И. Аллергология и иммунология: Национальное руководство. М.: *Гэотар-Медиа*. 2009. 649с.
- [9] Воробьева О.В., Гушин И.С. Контролируемые исследования эффективности и безопасности аллергенспецифической иммунотерапии: исторический аспект. *Российский аллергологический журнал*. 2011. №4. С.3-14.
- [10] Курбачева О.М., Павлова К.С. Аллерген-специфическая иммунотерапия. *Доктор.ру*. 2010. №3. С.16-19.
- [11] Желтикова Т.М. Аллергены для аллерген-специфической иммунотерапии: достижения и проблемы. *Consilium medicum (Педиатрия)*. 2012. №1. С.29-31.
- [12] European pharmacopoeia. 7th ed. suppl. 7.0 Strasbourg: *European Department for the Quality of Medicines*. 2010. Vol.1. 1207p.
- [13] Хлебцова Е.Б., Боков Д.О., Сорокина А.А. Анатомическое изучение травы лофанта анисового сорта «Астраханский 101». *Фармация*. 2013. №3. С.31-34.
- [14] Code of Federal Regulations Food and Drug Administration (21 680.1). "Allergenic Products". Vol.7. Date: 2011-04-01. P.133-136.
- [15] Pollen grains of Birch (*Betula* L). [Electronic resource]: *Scanning Electron Microscope pictures of grains of pollen*. Mode of access: <http://www.telegraph.co.uk/science/picture-galleries/> (date accessed: 25.07.2013).
- [16] Морохина С.Л., Боков Д.О. Сравнительное изучение химического состава БАВ и анатомо-диагностических признаков травы душицы обыкновенной и душицы турецкой. *Бутлеровские сообщения*. 2012. Т.32. №11. С.69-74.
- [17] Токарев П.И. Морфология и ультраструктура пыльцевых зерен. М.: *Т-во научн. изд. КМК*. 2002. 51с
- [18] Ошуркова М.В. Описание пыльцы некоторых видов берез, произрастающих на территории СССР. *Проблемы ботаники*. М.: *Изд-во АН СССР*. Вып.4. 1959. С.68-91.
- [19] Филина Н.И. Морфология пыльцы берез Сибири и Дальнего Востока. Пыльца видов секции *Albae* Rgl. *Науч. докл. высшей школы. Биол. науки*. 1980. №10. С.65-74.
- [20] Дёмин М.С., Осипов В.И., Демина Н.Б., Быков В.А. Состав метаболитов липофильной фракции плодов ноготков лекарственных. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2010. №3. С.32-35
- [21] Боков Д.О., Морохина С.Л., Пятигорская Н.В., Попов Д.М. Современные подходы к изучению химического состава лекарственного растительного сырья представителей рода *Origanum* L. и разработка методов его стандартизации. *Бутлеровские сообщения*. 2013. Т.35. №7. С.94-101.
- [22] Берёза Н.С., Родионова Е.А., Павлова Л.А., Коваленко А.Е., Кардонский Д.А., Еганов А.А. Стандартизация сырья Падуба парагвайского. Часть 1. Разработка методики определения метилксантинов в сырье падуба парагвайского и проведение сравнительного анализа состава сырья. *Бутлеровские сообщения*. 2012. Т.32. №11. С.81-84.
- [23] Боков Д.О. Разработка подходов к стандартизации и методов контроля качества аллергенных экстрактов, применяемых при проведении аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ). Медицинская весна: сборник материалов итоговой всероссийской студенческой научной конференции с международным участием (25-26 апреля 2013 г.). М.: *Издательство Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова*. 2013. С.214-215.
- [24] Люст Е.Н. Обнаружение тианептина и морфина в биологической жидкости хроматографическими методами при совместном присутствии. *Бутлеровские сообщения*. 2013. Т.34. №4. С.123-128-74.
- [25] Эрдтман Г. Морфология пыльцы и систематика растений (введение в палинологию). Покрытосеменные. М.: *Изд-во иностранной литературы*. 1956. 486с.
- [26] Аветисян Е.М. Упрощенный ацетолитный метод обработки пыльцы. *Ботанический журнал*. Вып.35. №4. 1950. С.385-386.
- [27] Государственная фармакопея СССР XI издание. Вып. 1. Общие методы анализа. МЗ СССР. XI изд. М.: *Медицина*. 1987. 336с.
- [28] Альтами. [Электронный ресурс]: *Лабораторное оборудование и программное обеспечение в России*. Режим доступа: <http://altami.ru/> (дата обращения: 30.07.2013).
- [29] Singer B.D., Ziska L.H., Frenz D.A. Increasing Amb a 1 content in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen as a function of rising atmospheric CO₂ concentration. *Functional Plant Biology*. 2005. №32. P.667-670.