

На правах рукописи

Прожд

ПРОЖОГИНА

Юлия Эдуардовна

**ГЛУБОКИЕ ЭВТЕКТИЧЕСКИЕ РАСТВОРИТЕЛИ КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ
ЭКСТРАГЕНТЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ
РАСТИТЕЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ**

Специальность: 3.4.1. Промышленная фармация и
технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»

Научный руководитель:

Джавахань Марина Аркадьевна

доктор фармацевтических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Саканян Елена Ивановна

доктор фармацевтических наук, профессор, Акционерное общество «Научно-производственное объединение по иммунобиологическим препаратам» «Микроген», директор по науке

Облучинская Екатерина Дмитриевна

кандидат фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Мурманский морской биологический институт» Российской академии наук, руководитель научно-исследовательской группы биохимии и технологии (гидробионтов) водорослей и беспозвоночных лаборатории зообентоса, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «19» сентября 2023 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте организации (<https://sites.google.com/a/pharminnotech.com/dissovet>).

Автореферат разослан « ____ » _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.063.01,
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Природные биологически активные вещества (БАВ), источником которых являются растения, давно применяются в медицине и уже доказали свою эффективность благодаря генерализованному действию на организм. Однако действующие соединения, обладающие терапевтическим эффектом, необходимо сначала выделить из растительного материала в индивидуальном виде для возможности дальнейшей обработки. Традиционные методы выделения БАВ из растений с применением органических экстрагентов имеют свои недостатки из-за высокой летучести данных веществ и вреда для окружающей среды. В настоящее время в научном мире ведется активный поиск альтернативных экстрагентов, и уже достигнуты определенные успехи в этой области: получены и активно изучаются так называемые «зеленые» экстрагенты – глубокие эвтектические растворители (ГЭР). Являясь в большинстве своем экологически чистыми и биodeградируемыми соединениями, они к тому же обладают способностью извлекать различные БАВ из лекарственного растительного сырья. Многокомпонентный состав ГЭР и возможность изменять свойства экстрагента с помощью варьирования исходных веществ, их мольных соотношений, вязкости получаемого соединения позволяют получать селективный экстрагент с заданными свойствами. Несложный и легко осуществимый процесс синтеза ГЭР – еще одно преимущество нового класса экстрагентов. Поэтому изучение возможности экстракции БАВ из природных источников с применением ГЭР является перспективной и актуальной областью научных исследований.

Степень разработанности темы. Вопросы изучения глубоких эвтектических растворителей и возможности их применения для выделения БАВ из растительного сырья уделяется много внимания в последние годы, и он является актуальным в настоящий момент. Существенный вклад в изучение данной темы внесли зарубежные ученые: А.Р. Abbott, Y.H. Choi, Y. Dai, E. Durand и др. Среди отечественных ученых теме глубоких эвтектических растворителей посвящены труды авторов Шикова А.Н., Облучинской Е.Д., Цветова Н.С. и других исследователей.

Однако в указанных работах не приведены результаты по изучению процесса экстракции БАВ из многокомпонентных растительных композиций с применением ГЭР. Также не приводятся сравнения экстрагирующей способности ГЭР и традиционного экстрагента – водного раствора этилового спирта, - после оптимизации условий каждого из процессов экстракции. Это и предопределило цель и задачи настоящего исследования.

Цель работы. Целью работы было теоретическое обоснование и экспериментальное исследование возможности экстракции БАВ из модельной растительной композиции с применением глубоких эвтектических растворителей (ГЭР).

Для достижения цели поставлены и решены следующие основные задачи:

1. Провести информационно-аналитический обзор научной и патентной литературы в области экстракции БАВ из растительного сырья с использованием в качестве альтернативных экстрагентов ГЭР.

2. Провести оптимизацию процесса экстракции БАВ из модельной растительной композиции с применением водного раствора этилового спирта в качестве экстрагента с использованием метода математического моделирования эксперимента.
3. Разработать составы экспериментальных образцов ГЭР, провести изучение их экстрагирующей способности для обоснования выбора состава ГЭР для выделения БАВ из растительной композиции, подобрать оптимальные условия процесса экстрагирования и изучить состав экстрагируемых БАВ.
4. Разработать технологию экстракции БАВ из растительной композиции с применением в качестве экстрагента экспериментально обоснованного с точки зрения эффективности экстракции состава ГЭР.
5. Провести валидацию методики количественного определения суммы флавоноидов, извлекаемых ГЭР в качестве экстрагента, в пересчете на рутин, из модельной растительной композиции.
6. Провести сравнительный анализ экстрагирующей способности водного раствора этилового спирта и предлагаемого состава ГЭР.

Научная новизна состоит в следующем:

1. Установлен оптимальный с точки зрения извлекающей способности состав глубокого эвтектического растворителя как потенциального экстрагента флавоноидов из изучаемой растительной композиции.
2. Впервые установлен компонентный состав БАВ, извлекаемых с помощью водного раствора этилового спирта и выбранного состава глубокого эвтектического растворителя, с использованием современных физико-химических методов: дифференциальной спектрофотометрии и ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией.
3. Впервые проведен сравнительный анализ экстрагирующей способности водного раствора этилового спирта и выбранного ГЭР на примере многокомпонентной модельной растительной композиции.
4. Получены два патента на изобретения – способы экстракции БАВ из растительного сырья с применением в качестве экстрагентов глубоких эвтектических растворителей с необходимостью дальнейшего удаления экстрагента (Патент № 2782459 С1, Патент № 2794516 С1).

Теоретическая значимость работы:

Представлены экспериментальные данные о возможности извлечения БАВ из модельной растительной композиции, в состав которой входят: 4 части травы пустырника обыкновенного, 2,5 части травы зверобоя продырявленного, 2,5 части травы Melissa лекарственной, 1 часть травы тимьяна ползучего, с помощью глубоких эвтектических растворителей. Обоснован выбор состава ГЭР по критерию экстрагирующей способности. Продемонстрировано влияние различных внешних факторов (температуры, содержания воды), а также свойств экстрагента на эффективность процесса экстракции.

Практическая значимость работы:

Получены различные составы экспериментальных образцов ГЭР, описаны преимущества и недостатки полученных составов экспериментальных образцов ГЭР. Разработана и утверждена технологическая инструкция на получение с помощью глубокого эвтектического растворителя извлечения из модельной растительной композиции. Предложена технологическая схема процесса экстракции БАВ из растительной композиции с применением в качестве экстрагента выбранного по критерию извлекающей способности состава ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды с получением извлечения.

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова (Акт о внедрении в учебный процесс № 092/23/110-03 от 01.03.2023 г.).

Методология и методы исследования. Методология исследования базируется на изучении имеющихся научных данных, аналитической обработке литературных источников и непосредственном практическом применении апробированных научных методов.

В работе использованы современные методы анализа: методы макро- и микроскопического анализа, спектрофотометрический метод анализа, метод ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией, метод ИК-спектрометрии, метод поляриметрии. При проведении экспериментальной части руководствовались статьями ГФ XIV издания. Были применены методы математического моделирования. Результаты экспериментов подвергались статистической обработке.

Положения, выносимые на защиту:

- результаты по валидации методики количественного определения суммы флавоноидов, извлекаемых выбранным ГЭР в качестве экстрагента, в пересчете на рутин в экспериментальной растительной композиции с помощью дифференциальной спектрофотометрии;
- результаты установления компонентного состава БАВ, извлекаемых с помощью водного раствора этилового спирта и выбранного ГЭР, современными физико-химическими методами;
- данные сравнительного анализа экстрагирующей способности водного раствора этилового спирта и выбранного ГЭР на примере многокомпонентной модельной растительной композиции;
- технология экстракции БАВ из растительной композиции с применением в качестве экстрагента выбранного по критерию экстрагирующей способности состава ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды с получением извлечения. Технологическая схема данного процесса.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений».

Личный вклад автора.

Все экспериментальные исследования выполнены лично автором или при его непосредственном участии с соавторами научных публикаций. Степень личного участия в общем объёме работ составляет не менее 90%. Автор непосредственно участвовал в обсуждении цели и задач исследования, в разработке плана эксперимента, интерпретации полученных результатов, осуществлял написание статей и текста диссертационной работы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения, изложенные в диссертационной работе, соответствуют паспорту специальности 3.4.1 – промышленная фармация и технология получения лекарств (фармацевтические науки) по пункту: 2 – «Проектирование и разработка технологий получения фармацевтических субстанций и лекарственных форм, утилизация производственных отходов с учетом экологической направленности. Стандартизация и валидация процессов и методик, продуктов и материалов. Оптимизация организационных и технологических процессов при разработке и получении лекарственных средств».

Степень достоверности и апробация результатов работы. Достоверность полученных результатов подтверждается проведением экспериментов в нескольких повторностях, валидацией физико-химического метода количественного определения БАВ с помощью дифференциальной спектрофотометрии, использованием высокотехнологичных методов качественного и количественного анализа соединений.

Основные положения и результаты работы доложены и обсуждены на:

- IX Международной научной конференции молодых учёных «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Россия, Москва, ВИЛАР, 2021);
- Международной научной конференции «От биохимии растений к биохимии человека» (Россия, Москва, ВИЛАР, 2022);
- X Международной научной конференции молодых учёных «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Россия, Москва, ВИЛАР, 2022).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 6 статей – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации. Получено 2 патента на изобретения.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 202 печатных страницах, состоит из введения, обзора литературы, характеристики объектов и методов исследования, четырех глав исследовательской работы, заключения, списка

использованной литературы, включающего 93 источника, в том числе 68 – зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 32 рисунками, 25 таблицами. В состав работы входит восемь приложений.

Содержание работы

Во введении обоснована актуальность работы, приведены цели и задачи исследования, обоснована научная новизна изучаемой темы.

В главе 1 приведена характеристика процесса экстракции, описаны стадии процесса экстрагирования, такие как капиллярная пропитка материала, растворение компонентов растительной клетки, переход растворенных веществ в экстрагент. Охарактеризованы факторы, влияющие на процесс извлечения БАВ: степень измельчения сырья, разность концентраций, температура, вязкость экстрагента, время экстрагирования. Приведены требования, предъявляемые к экстрагенту.

Далее представлено описание глубоких эвтектических растворителей. Термин “эвтектика” используется для описания смеси двух или более соединений, которая при четко определенном составе демонстрирует уникальные физико-химические свойства и минимальную температуру плавления на фазовой диаграмме. Глубокие эвтектические растворители (ГЭР) характеризуются значительным («глубоким») снижением температуры плавления по сравнению с индивидуальной температурой плавления составляющих их веществ. Причиной данного явления является делокализация заряда, происходящая между молекулами донора и акцептора H^+ . Также предполагается, что донор протонов действует как комплексообразователь, и при взаимодействии увеличивается эффективный размер молекул, что, в свою очередь, уменьшает $T_{пл}$ смеси. Приводится история изучения ГЭР, их структурные характеристики, физико-химические свойства, токсикологический профиль и перспективы дальнейших исследований. Установлено, что свойства ГЭР отличаются от характеристик составляющих их веществ: например, токсичность ГЭР превышает простой суммарный токсикологический профиль их компонентов; то же можно сказать и о цитотоксичности и антимикробной активности эвтектических растворителей. Причиной этого могут служить качественный состав ГЭР (взаимное влияние входящих в состав ГЭР веществ), молярное соотношение компонентов, вязкость. Приведены известные методы удаления экстрагента – ГЭР – после процесса экстракции.

Во второй главе описаны материалы и методы исследования.

Объектом исследования являлась четырехкомпонентная растительная композиция, состоящая из следующих видов лекарственного растительного сырья: *Herba leonuri* – травы пустырника, *Hyperici herba* – травы зверобоя, *Melissae officinalis herba* – травы Melissa лекарственной, *Thymi serpylli herba* – травы чабреца, – в соотношении 4 : 2,5 : 2,5 : 1, соответственно. Состав и содержание каждого компонента в растительной композиции были ранее предложены сотрудниками отдела фармакологии Центра

медицины ФГБНУ ВИЛАР на основании экспериментальных исследований *in vivo* на белых нелинейных мышах в количестве 122 особей.

В качестве экстрагентов использовались спирт этиловый различной концентрации, а также водные растворы 25 составов глубоких эвтектических растворителей.

В данной работе использовали метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях спектра, основываясь на положениях ГФ XIV издания (ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»). Для оценки суммарного содержания флавоноидов в извлечениях из изучаемой растительной композиции был использован метод дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 410 ± 2 нм. Все измерения проводились на спектрофотометре Shimadzu UV-1800.

Анализ методом ИК-спектрометрии осуществляли в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0002.15 «Спектрометрия в инфракрасной области». Измерения проводили на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 6700 в среднем спектральном диапазоне $4000-400$ см⁻¹.

С целью наиболее полного анализа состава БАВ, извлеченных с применением в качестве экстрагента 1) 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 (ГЭР-23) и 2) 70 %-ого этилового спирта, – качественную оценку содержания экстрагируемых веществ проводили методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (УЭЖХ-МС/МС). Испытания проводили согласно методикам, описанным в ГФ XIV издания (ОФС 1.2.1.1.0008.15 «Масс-спектрометрия» и ОФС 1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

При измерении угла вращения экспериментального извлечения руководствовались положениями ГФ XIV издания, ОФС 11.2.1.0018.15 «Поляриметрия». Исследование оптических характеристик извлечения осуществляли с использованием поляриметра POL-1/2 (Atago, Japan) при температуре 25 °С.

Потенциометрическое определение водородного показателя рН определяли согласно положениям ГФ XIV издания, ОФС 1.2.1.0004.15 «Ионометрия», метод 3 с помощью рН-метра лабораторного WTW InoLab рН 7110.

В третьей главе представлены результаты математического моделирования процесса экстрагирования БАВ из модельной растительной композиции с применением водного раствора этилового спирта с учетом взаимного влияния факторов.

Для выяснения роли независимых факторов (концентрации этилового спирта как экстрагента, температуры экстракции и соотношения сырье : экстрагент) в варьировании изучаемой величины (количественном содержании флавоноидов в пересчете на рутин) было решено использовать ортогональное планирование второго порядка.

Пусть y – содержание флавоноидов в пересчете на рутин (мг/г относительно массы сухого сырья). Для математической оценки процесса был поставлен трехфакторный эксперимент, переменными величинами которого являлись температура экстракции X_1 ,

°С, содержание экстрагента по отношению к исходному сырью X_2 , частей, и концентрация этилового спирта X_3 , %. В качестве основного уровня (a_i) были выбраны параметры: температура 60 °С, 12 частей экстрагента (на 1 часть сырья) и 70 %-ый этиловый спирт. За интервал варьирования взяты значения (\pm) 10 °С, 2 части экстрагента и 10 % содержания этилового спирта, соответственно. Значения нижних и верхних уровней переменных факторов представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Значения уровней факторов и интервалы варьирования

Факторы Уровни факторов	Температура экстракции, °С	Содержание экстрагента по отношению к исходному сырью, частей	Концентрация этилового спирта, %
	X_1	X_2	X_3
Нижний уровень	50	10	60
Основной уровень	60	12	70
Верхний уровень	70	14	80

В качестве кодовых обозначений переменных факторов были выбраны значения (-) – для нижнего уровня, 0 – для основного и (+) – для верхнего уровней (таблица 2).

Таблица 2 – Кодовые обозначения уровней факторов

Факторы Уровни факторов	Температура экстракции, °С	Содержание экстрагента по отношению к исходному сырью, частей	Концентрация этилового спирта, %
	Кодовые обозначения		
Нижний уровень	-		
Основной уровень	0		
Верхний уровень	+		

Для нахождения максимума функции в области $X_i \in (a_i - c_i; a_i + c_i)$, было решено использовать композиционный план эксперимента (таблица 3).

Таблица 3 - Схема композиционного плана эксперимента

Переменные Характеристики	X ₁	X ₂	X ₃	y
a _i	60	12	70	
c _i	10	2	10	
№ опыта	x ₁	x ₂	x ₃	
1	+	+	+	1,14
2	+	+	-	1,02
3	+	-	+	1,30
4	+	-	-	1,27
5	-	+	+	1,15
6	-	+	-	1,09
7	-	-	+	1,33
8	-	-	-	1,29
9	0	0	0	1,35
10	-	0	0	1,30
11	+	0	0	1,31
12	0	-	0	1,33
13	0	+	0	1,31
14	0	0	-	1,29
15	0	0	+	1,32
Σ				18,80

Было получено уравнение, характеризующее процесс экстракции:

$$\hat{y} = 1,429 - 0,081x_2 + 0,028x_3 - 0,1x_1^2 - 0,091x_2^2 - 0,1x_3^2,$$

где факторы X_i связаны с переменными x_i по формуле:

$$X_i = a_i + x_i c_i.$$

При анализе данной функции было найдено:

$$X_1 = a_1 + x_1 c_1 = 60^\circ\text{C}$$

$$X_2 = a_2 + x_2 c_2 = 12 - 0,445 \times 2 = 11,11$$

$$X_3 = a_3 + x_3 c_3 = 70\% + 0,14 \times 10\% = 71,4\%$$

Так как различие вычисленных максимумов функции со значениями основных факторов статистически недостоверно, было решено оставить базовые параметры в качестве оптимальных.

Таким образом, оптимальные параметры традиционного экстрагирования флавоноидов из модельной растительной композиции: степень измельчения сырья – 2-3 мм, экстрагент – этиловый спирт 70 %-ой концентрации, температура экстракции – 60°C,

время экстракции – 1 час, соотношение сырье : экстрагент – 1:12. Проведенная в соответствии с вышеперечисленными условиями экстракция позволила извлечь $13,30 \pm 0,20$ мг/г (относительно массы сухого сырья) флавоноидов в пересчете на рутин из модельной растительной композиции.

Глава 4 посвящена разработке технологии экстрагирования БАВ из растительной композиции с применением глубоких эвтектических растворителей в качестве экстрагентов.

В данной работе был предложен метод получения 25 экспериментальных составов глубоких эвтектических растворителей. Первоначальный выбор компонентов ГЭР был основан именно на их химической структуре и низкой летучести, с целью скрининга экстрагирующей способности ГЭР как нового класса веществ для дальнейшего поиска путей их оптимизации и усовершенствования их качественного и количественного составов.

В качестве акцепторов протона использовались бетаина гидрохлорид, холина битартрат и холина хлорид, в качестве доноров – некоторые органические кислоты, спирты и сахара (такие как лимонная кислота, глюкоза, фруктоза и т.д.).

Глубокие эвтектические растворители были изготовлены с помощью теплового метода: компоненты смешивали в определенных соотношениях по количеству вещества (согласно мольным концентрациям), смеси в стеклянной конической колбе закрывали пробкой и нагревали на водяной бане при температуре $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ и постоянном перемешивании магнитной мешалкой со скоростью 1000 оборотов в минуту до тех пор, пока не образовывалась жидкость однородной структуры, сохраняющая стабильность при комнатной температуре.

Около 2 г (точная навеска) исследуемого сырья (модельной растительной композиции) помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 30 мл 50 %-ого водного раствора полученного глубокого эвтектического растворителя, колбу закрывали пробкой. Затем колбу нагревали при температуре $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 ч, содержимое перемешивали с помощью магнитной мешалки. Колбу охлаждали до комнатной температуры, содержимое колбы фильтровали для дальнейшего анализа через фильтр бумажный обеззоленный.

Проведенная описанным выше способом экстракция БАВ из растительной композиции с применением экспериментальных составов ГЭР выявила экстрагент со статистически достоверной наилучшей извлекающей способностью, для последующего изучения (рисунок 1). Таким образом, для дальнейших исследований был выбран ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 (ГЭР-23).

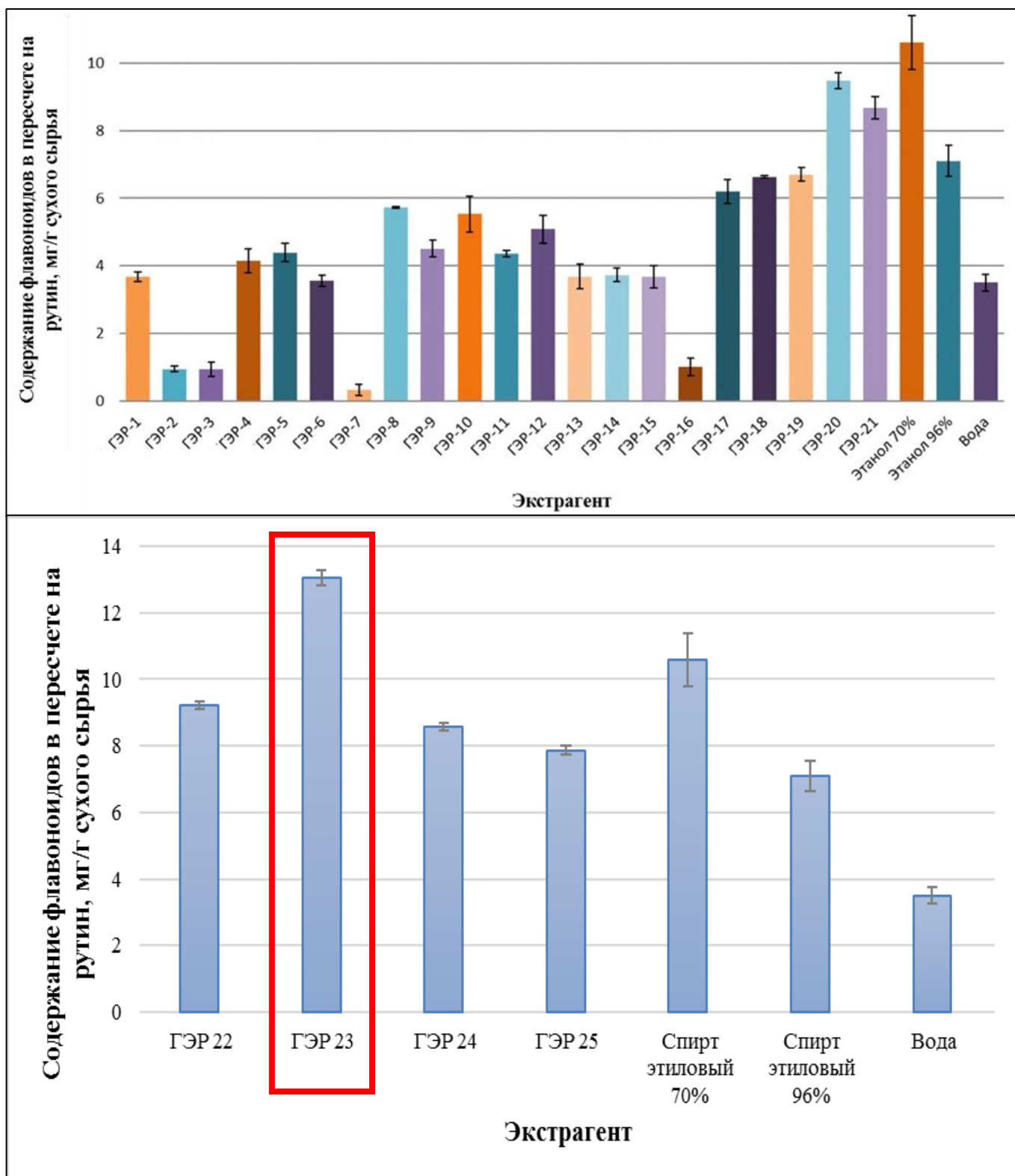


Рисунок 1 - Содержание флавоноидов (мг/г), извлекаемое с применением различных экстрагентов*
 *В качестве экстрагента применялись 50 %-ые водные растворы соответствующих ГЭР

В связи с тем, что ГЭР обладают высокой вязкостью, они не могут в нативном виде быть использованы в качестве экстрагентов биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья из-за ограничения смачивания компонентов жидкостью и малой скорости диффузии. На основании этого были изготовлены водные растворы выбранного экстрагента – ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в

мольном соотношении 2:1:1 (ГЭР-23) – различного соотношения эвтектический растворитель : вода (по массе) и исследованы на предмет способности к извлечению БАВ из растительной композиции.

Результаты зависимости экстрагирующей способности ГЭР-23 от процентного содержания воды в экстрагенте были исследованы экспериментальным методом. Было установлено, что оптимальное содержание воды в составе экстрагента составляет 50 % (рисунок 2а).

Чтобы определить оптимальный температурный режим экстракции, была осуществлена экстракция флавоноидов из экспериментальной растительной композиции при температурах 50, 60, 70 и 80 °С с использованием 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 (ГЭР-23) в качестве экстрагента. На основании полученных экспериментальных данных было установлено, что оптимальная температура, позволяющая извлечь из сырья и сохранить наибольшее количество флавоноидов с использованием 50 %-ого водного раствора ГЭР-23 в качестве экстрагента, составляет 60 °С (рисунок 2б).

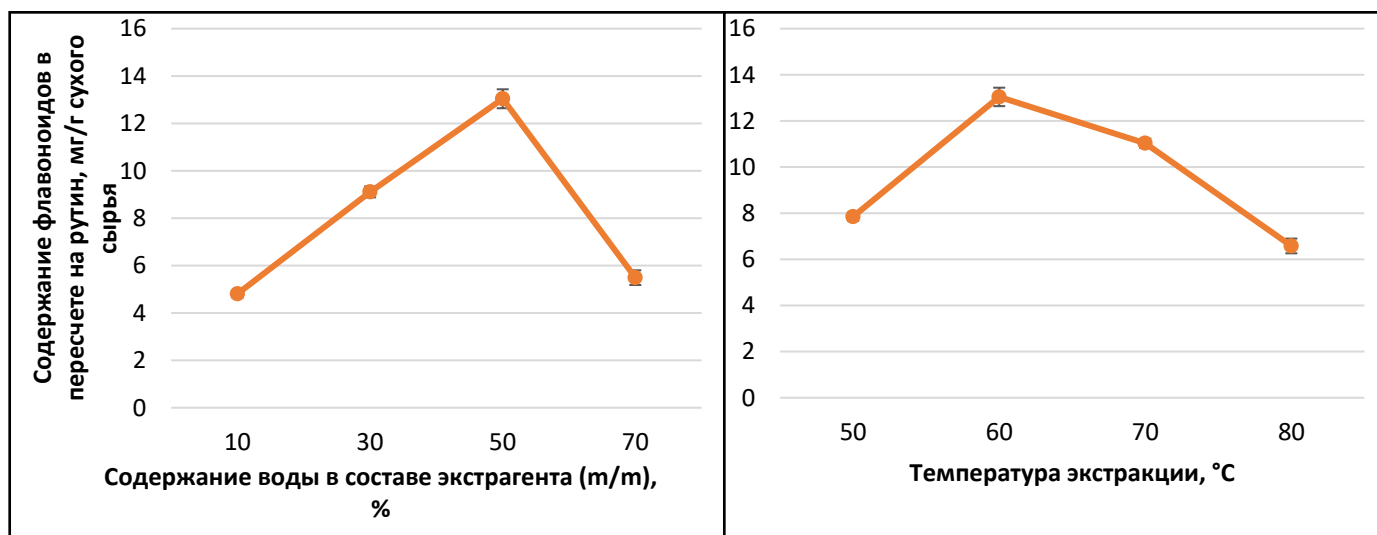


Рисунок 2 – а) Зависимость извлекающей способности ГЭР-23 от содержания воды;
б) Зависимость извлекающей способности 50 %-ого водного раствора ГЭР-23 от температуры экстракции

Таким образом, при оптимальных условиях экстракции, а именно при применении 50 %-ого водного раствора ГЭР, состоящего из холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1, при 60 °С удается извлечь $13,04 \pm 0,23$ мг/г (относительно массы сухого сырья) флавоноидов в пересчете на рутин.

Полученное извлечение было изучено методом поляриметрии. Было показано, что оптические свойства извлечения отличны от таковых для чистого экстрагента. Продемонстрировано влияние процесса экстракции на значения водородного показателя: рН ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды (50 %-ый водный раствор) = 5,96; рН извлечения из растительной композиции, полученного с помощью 50 %-ого водного раствора ГЭР-23 = 5,47.

Процессуальная схема получения экстрагента – 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды – и извлечения из модельной растительной композиции на его основе представлена на рисунке 3; технологическая схема данных процессов представлена на рисунке 4.

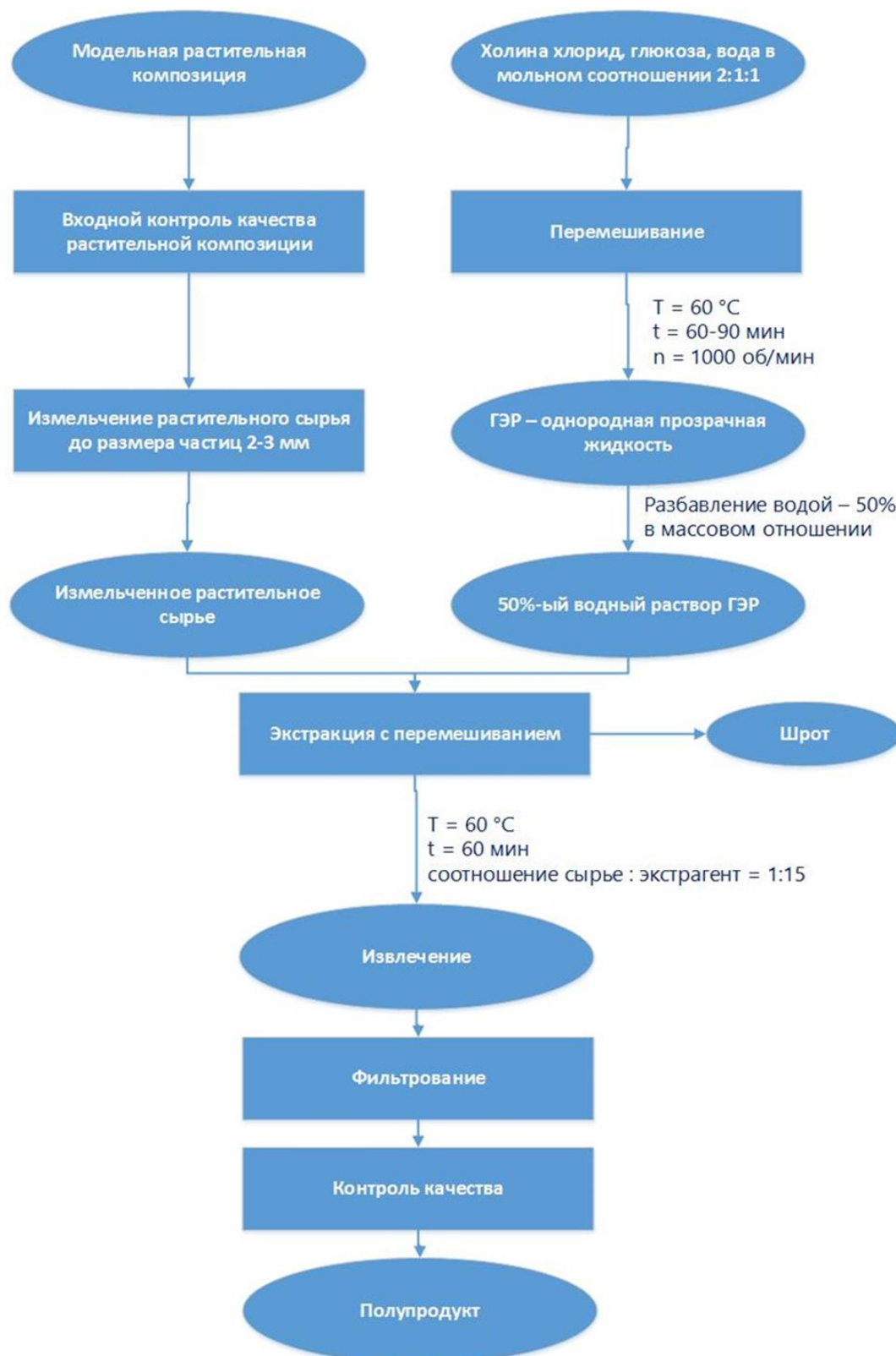


Рисунок 3 - Процессуальная схема получения экстрагента – 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды – и извлечения из модельной растительной композиции на его основе

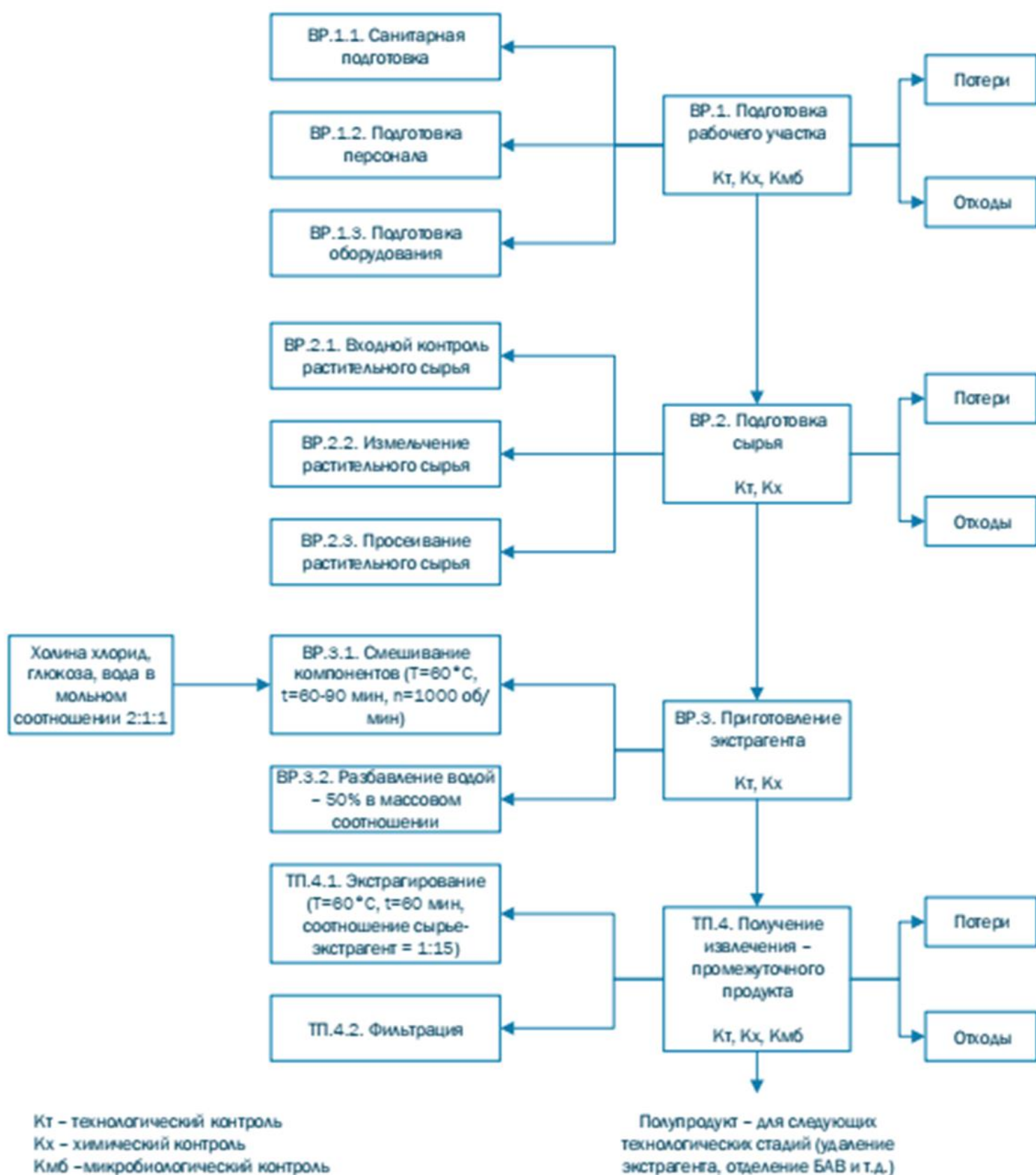


Рисунок 4 - Технологическая схема получения экстрагента – 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды – и полупродукта – извлечения из модельной растительной композиции на его основе

В пятой главе описана проведенная валидация методики количественного определения суммы флавоноидов, извлекаемых 50 %-ым водным раствором ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 в качестве экстрагента, в пересчете на рутин в экспериментальной растительной композиции (метод дифференциальной спектрофотометрии).

Дифференциальный УФ-спектр суммы флавоноидов извлечения в диапазоне длин волн от 350 до 500 нм представлен на рисунке 5.

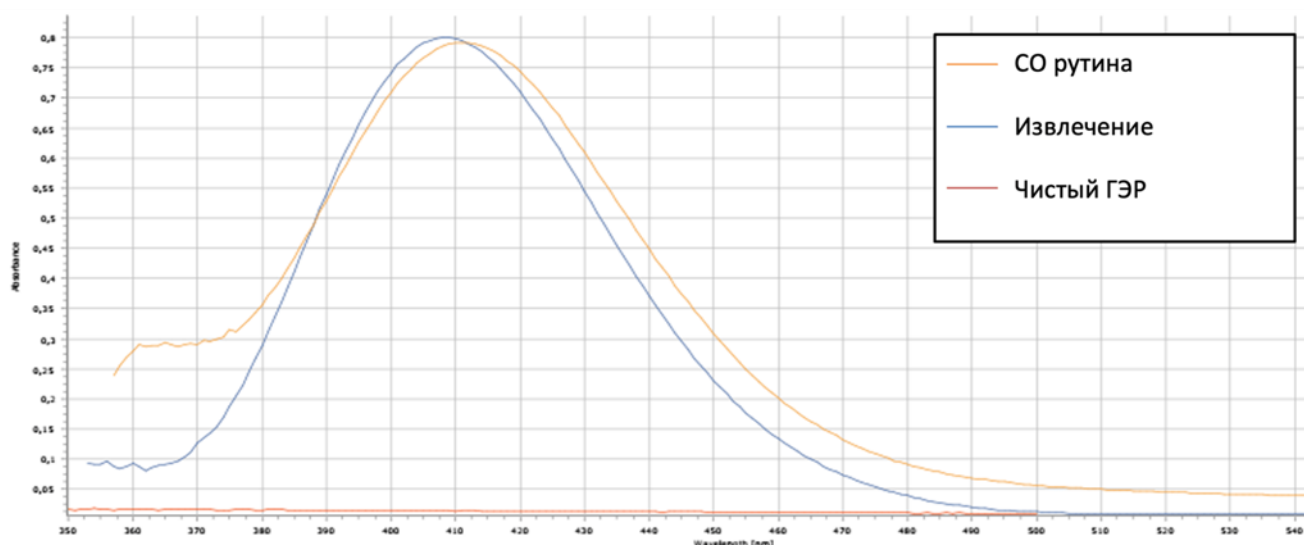


Рисунок 5 - Дифференциальные УФ-спектры комплексов изучаемого извлечения с алюминия хлоридом и СО рутин с алюминия хлоридом

Полученные экспериментальные данные позволяют оценить методику количественного определения содержания суммы флавоноидов, извлекаемых 50%-ым водным раствором ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды (2:1:1) в качестве экстрагента, в пересчете на рутин в экспериментальной растительной композиции положительно по параметрам:

- контроль специфичности методики (совпадение максимумов поглощения при длине волны 410 ± 2 нм);
- контроль линейности методики (коэффициент корреляции 0,9916);
- контроль правильности (точности) методики (диапазон процента восстановления – от 97,07% до 102,21%);
- контроль внутрилабораторной прецизионности методики:
 - сходимость методики (коэффициент вариации 1,704%);
 - воспроизводимость методики (коэффициент вариации внутрилабораторной воспроизводимости не превышает 10 %).

В главе 6 приведены результаты изучения состава БАВ, извлекаемых из экспериментальной растительной композиции с использованием в качестве экстрагента 1) 50 %-ого раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном

соотношении 2:1:1 и 2) 70 %-ого этилового спирта, с помощью инструментальных методов анализа, а именно дифференциальной спектрофотометрии и ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (УЭЖХ-МС/МС).

Сравнительных анализ экстрагирующей способности изучаемых экстрагентов для модельной растительной композиции представлен на рисунке 6. Показано, что при условиях, оптимальных для каждого процесса, эффективность экстракции БАВ с применением в качестве экстрагентов 70%-ого водного раствора этилового спирта и 50%-ого водного раствора ГЭР-23 эквивалентна.

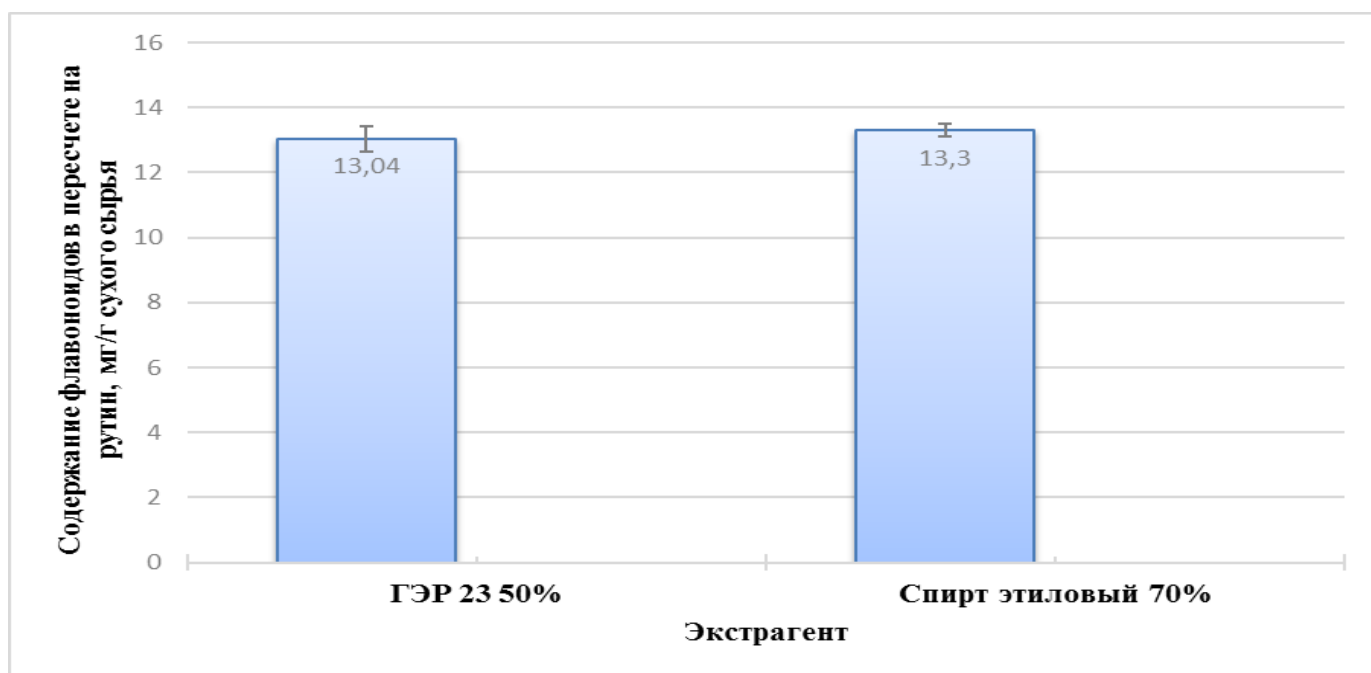


Рисунок 6 - Содержание флавоноидов (мг/г), извлекаемых с применением 50 %-ого водного раствора ГЭР-23 и 70 %-ого этилового спирта в качестве экстрагентов в оптимальных условиях для каждого процесса

С помощью метода УЭЖХ-МС/МС продемонстрирован обширный спектр полифенольных соединений в составе извлечений (рисунок 7). Показано, что хроматографический профиль извлечений, полученных с применением в качестве экстрагента 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 и 70 %-ого этилового спирта, очень близки, что указывает на сопоставимый качественный состав извлекаемых БАВ.

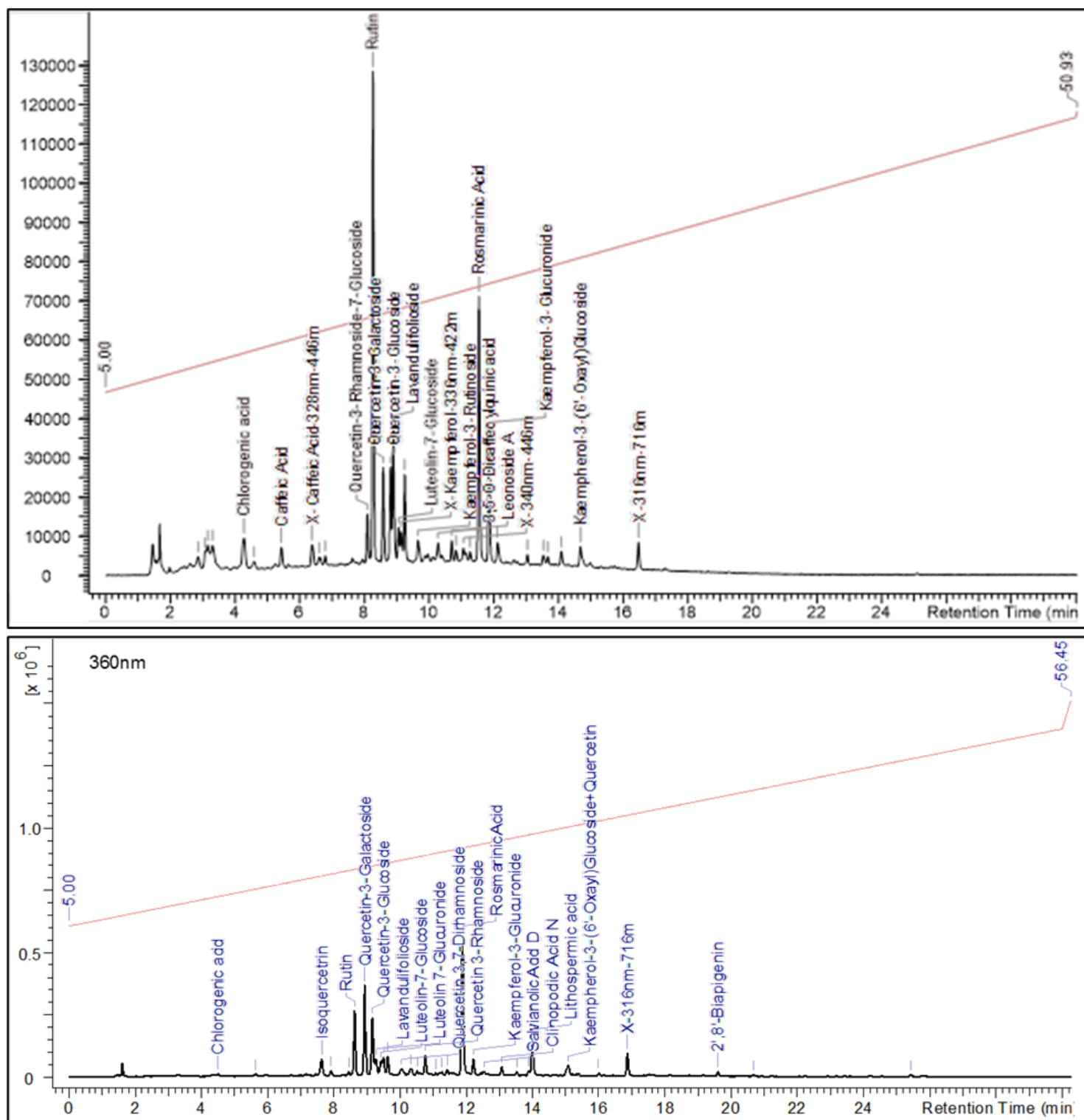


Рисунок 7 – Хроматограмма

- а) извлечения с использованием в качестве экстрагента 50%-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в соотношении 2 моль : 1 моль : 1 моль (ГЭР-23);
 б) извлечения с использованием в качестве экстрагента 70%-ого этилового спирта

В таблице 4 представлен расчет относительного содержания в извлечениях веществ, экстрагируемых с помощью двух сравниваемых экстрагентов. Каждый экстрагент имеет преимущество по эффективности извлечения определенных групп БАВ, например, выход хлорогеновой кислоты при экстракции 50%-ым водным раствором ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в соотношении 2 моль : 1 моль

: 1 моль составляет 272,8% от выхода при экстракции 70%-ым водным раствором этилового спирта. Таким образом, выбор типа экстрагента должен определяться задачами исследований по проведению направленной экстракции БАВ.

Таблица 4 – Сравнительный анализ экстрагирующей способности 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в соотношении 2 моль : 1 моль : 1 моль (ГЭР-23) и 70 %-ого этилового спирта.

Название БАВ	БАВ, извлекаемые с применением 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в соотношении 2 моль : 1 моль : 1 моль (ГЭР-23) – 1			БАВ, извлекаемые с применением 70 %-ого этилового спирта – 2			Относительное содержание БАВ (1 к 2)
	Площадь пика (360 нм)	Разбавление	Объем вкола, мкл	Площадь пика (360 нм)	Разбавление	Объем вкола, мкл	
Хлорогеновая кислота	58750600	2	2	1.08E+08	1	5	272.8%
Рутин	3.98E+08	2	2	9.5E+08	1	5	209.3%
Гиперозид	83401992	2	2	1.38E+09	1	5	30.2%
Кверцетин-3-глюкозид	84092288	2	2	9.31E+08	1	5	45.2%
Лавандулифолиозид	1.15E+08	2	2	2.85E+08	1	5	201.5%
Лютеолин-7-глюкозид	29928164	2	2	2.1E+08	1	5	71.4%
Вербаскозид	72511976	2	2	2.6E+08	1	5	139.3%
Розмариновая кислота	2.48E+08	2	2	2.36E+09	1	5	52.6%
Кемпферол-3-глюкуронид	1.23E+08	2	2	2.25E+08	1	5	272.3%
Кемпферол-3-(6'-оксаил)-глюкозид	27931066	2	2	2.53E+08	1	5	55.1%
X-316nm-716m	29296208	2	2	3.52E+08	1	5	41.7%

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведен анализ данных научной и патентной литературы, описывающих процесс экстракции БАВ, факторы, влияющие на ее эффективность (степень измельчения сырья, разность концентраций извлекаемых соединений на границе фаз, температура и время экстракции, вязкость экстрагента, структура растительного сырья, физико-химические свойства извлекаемых БАВ). Изучены современные данные о глубоких эвтектических растворителях, механизме их образования, их свойствах и характеристиках, токсикологическом профиле, экстрагирующей способности.
2. Методом математического моделирования эксперимента проведена оптимизация метода экстракции БАВ из модельной растительной композиции с применением водного раствора этилового спирта в качестве экстрагента. Установлены оптимальные параметры экстракции: степень измельчения сырья – 2-3 мм, экстрагент – этиловый спирт 70 %-ой концентрации, температура экстракции – 60 °С, время экстракции – 1 час, соотношение сырье : экстрагент – 1:12.
3. Получены различные составы экспериментальных образцов глубоких эвтектических растворителей, исследована их экстрагирующая способность на модельной растительной композиции. Выбран состав ГЭР, обладающий наибольшей

извлекающей способностью, состоящий из холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1. Осуществлен подбор условий экстрагирования флавоноидов из модельной растительной композиции с применением разработанного состава ГЭР. Установлено, что наилучшей экстрагирующей способностью обладает 50 %-ый водный раствор глубокого эвтектического растворителя на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 при температуре экстракции 60 °С и соотношении сырье : экстрагент –1:15 . В данных условиях извлекается $1,304 \pm 0,04$ %, или $13,04 \pm 0,4$ мг/г (относительно массы сухого сырья) флавоноидов в пересчете на рутин.

4. Разработана технология процесса экстракции БАВ из растительной композиции с применением в качестве экстрагента выбранного по критерию извлекающей способности состава ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1.
5. Проведена валидация методики количественного определения суммы флавоноидов, извлекаемых 50%-ым водным раствором ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды (2:1:1) в качестве экстрагента, в пересчете на рутин из экспериментальной растительной композиции по параметрам:
 - специфичность;
 - линейность;
 - правильность (точность);
 - сходимость;
 - воспроизводимость.
6. Методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (УЭЖХ-МС/МС) установлен состав БАВ, извлекаемых из экспериментальной растительной композиции с использованием в качестве экстрагентов 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 и 70 %-ого этилового спирта.
7. Проведен сравнительный анализ экстрагирующей способности изучаемых экстрагентов для различных БАВ, содержащихся в модельной растительной композиции. Показано, что у каждого экстрагента имеются преимущества по эффективности экстракции индивидуальных БАВ. Так, 50 %-ый водный раствор ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 способен извлечь из модельной растительной композиции большее количество хлорогеновой кислоты, рутина, лавандулифолиозида, вербаскозида и кемпферол-3-глюкуронида, тогда как 70 %-ый этиловый спирт более эффективен для экстракции гиперозида, кверцетин-3-глюкозида, лютеолин-7-глюкозида, розмариновой кислоты и кемпферол-3-(6'-оксаил)-глюкозида.

Перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования предполагают последующее изучение полученного извлечения и глубоких эвтектических растворителей: исследование их реологических параметров, определение

плотности, проведение дисперсионного анализа, определение стабильности в процессе хранения, изучение токсикологического профиля, – а также поиск методов удаления экстрагента (ГЭР).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Разработка капсул "Седофлав", стандартизация и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов / М. А. Джавахян, М. Г. Токарева, Ю. Э. Прожогина, Е. И. Каленикова // **Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9, № 3. – С. 118-127.**
2. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в жидком и сухом экстрактах растительной композиции / М. А. Джавахян, М. Г. Токарева, Н. Б. Фадеев, В. Н. Дул, Ю. Э. Прожогина, Е. И. Каленикова // **Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2021. – № 2(32). – С. 12-22.**
3. Прожогина, Ю. Э. Макро- и микроскопический анализ лекарственного растительного сбора седативного действия / Ю. Э. Прожогина, М. А. Джавахян, Н. В. Бобкова // **Фармация. – 2022. – Т. 71, № 5. – С. 18-24.**
4. Природные глубокие эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты флавоноидов из растительного сбора седативного действия / М. А. Джавахян, Ю. Э. Прожогина, О. К. Павельева, Е. И. Каленикова // **Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11, № 3. – С. 75-83.**
5. Джавахян, М. А. Глубокие эвтектические растворители на основе холина хлорида как перспективные экстрагенты флавоноидов из седативной растительной композиции / М. А. Джавахян, Ю. Э. Прожогина // **Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11, № 4. – С. 79-86.**
6. Джавахян, М. А. Глубокие эвтектические растворители: история, свойства и перспективы / М. А. Джавахян, Ю. Э. Прожогина // **Химико-фармацевтический журнал. – 2023. – Т. 57, № 2. – С. 27-31.**
7. Прожогина, Ю. Э. Эффективность седативных препаратов растительного происхождения в клинической практике / Ю. Э. Прожогина, М. А. Джавахян // **Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения : Сборник материалов IX Международная научная конференция молодых учёных, Москва, 16–17 декабря 2021 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", 2021. – С. 491-497.**
8. Prozhogina, Yu. E. Natural deep eutectic solvents as alternative flavonoid extractants from the sedative plant composition / Yu. E. Prozhogina, M. A. Dzhavakhyan // **сборник международной научной конференции «От биохимии растений к биохимии человека», 16–17 июня 2022 года, 2022. – С. 289-295.**
9. Prozhogina, Yu. E. The extraction ability of deep eutectic solvents / Yu. E. Prozhogina // **сборник X международной научно-практической конференции молодых ученых**

«Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения», 15–16 декабря 2022 года, 2022. – С. 313-318.

10. Патент № 2782459 С1 Российская Федерация. Способ экстракции флавоноидов из растительного сырья : № 2021126053 : заявл. 03.09.2021 : опубл. 27.10.2022 / М. А. Джавахян, А. Ю. Татаринцева, В. Н. Дул, Т. Д. Даргаева, О. А. Семкина, Е. В. Борисенко, Н. И. Сидельников, Ю. Э. Прожогина ; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений".
11. Патент № 2794516 С1 Российская Федерация. Способ экстракции полифенольных соединений из змееголовника молдавского : № 2021137494 : заявл. 17.12.2021 : опубл. 19.04.2023 / М. А. Джавахян, О.К. Павельева, А.Е. Бурова, Ю. Э. Прожогина, С. А. Павельев, Г. В. Адамов ; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений".

На правах рукописи

ПРОЖОГИНА

Юлия Эдуардовна

**ГЛУБОКИЕ ЭВТЕКТИЧЕСКИЕ РАСТВОРИТЕЛИ КАК АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ
ЭКСТРАГЕНТЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ
РАСТИТЕЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ**

Специальность: 3.4.1. Промышленная фармация и
технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук