

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ (ВИЛАР)»**

На правах рукописи

Прожа

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Джавахан Марина Аркадьевна,
доктор фармацевтических наук,
доцент

Москва - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ БАВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	10
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1	33
ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
ГЛАВА 3. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ ФЛАВОНОИДОВ ИЗ МОДЕЛЬНОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЭТИЛОВОГО СПИРТА МЕТОДАМИ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА	47
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3	55
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ГЛУБОКИХ ЭВТЕКТИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ	56
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4	89
ГЛАВА 5. ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ 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	91
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5	102
ГЛАВА 6. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ МЕТОДОВ... ..	103
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	127
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	138
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	139
Приложение А	140
Приложение Б	150
Приложение В.....	151
Приложение Г	156
Приложение Д	177
Приложение Е.....	200
Приложение Ж.....	201
Приложение З	202

ВВЕДЕНИЕ

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. Вопросу 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 мелиссы 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 объеме 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.

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ БАВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Характеристика процесса экстракции

Экстракция (лат. *extragere* - «вытягивать, извлекать») представляет собой метод извлечения вещества из раствора или смеси с помощью селективного, выбранного на основании заранее определенных критериев, растворителя, называемого экстрагентом [4].

Экстракция – сложный и многоступенчатый процесс, состоящий из многих стадий: растворения действующих веществ, десорбции, диффузии и других. Трудность извлечения БАВ из растительного сырья заключается, прежде всего, в сложном строении клеточной оболочки, или стенки, установленном методами электронной микроскопии и рентгеновской дифрактометрии. В ее структуре выделяют первичную и вторичную оболочки (рисунок 1).

Оболочка клетки пронизана ультрамикropорами диаметром 0,01 - 0,001 мкм и зачастую покрыта веществами, уменьшающими эти поры либо закупоривающими их, – протопектином, лигнином, суберином, кутином, восками и другими, которые мало- или нерастворимы в воде, что снижает проникновение экстрагента через оболочку внутрь клетки. Микропоры клеточной оболочки способны задерживать высокомолекулярные вещества, пропуская при этом низкомолекулярные соединения (как правило, биологически активные), частицы которых не превышают размеров пор. Другая отличительная особенность экстракции из растительного сырья – сорбционные явления, наблюдаемые в клетке после проникновения в нее экстрагента.

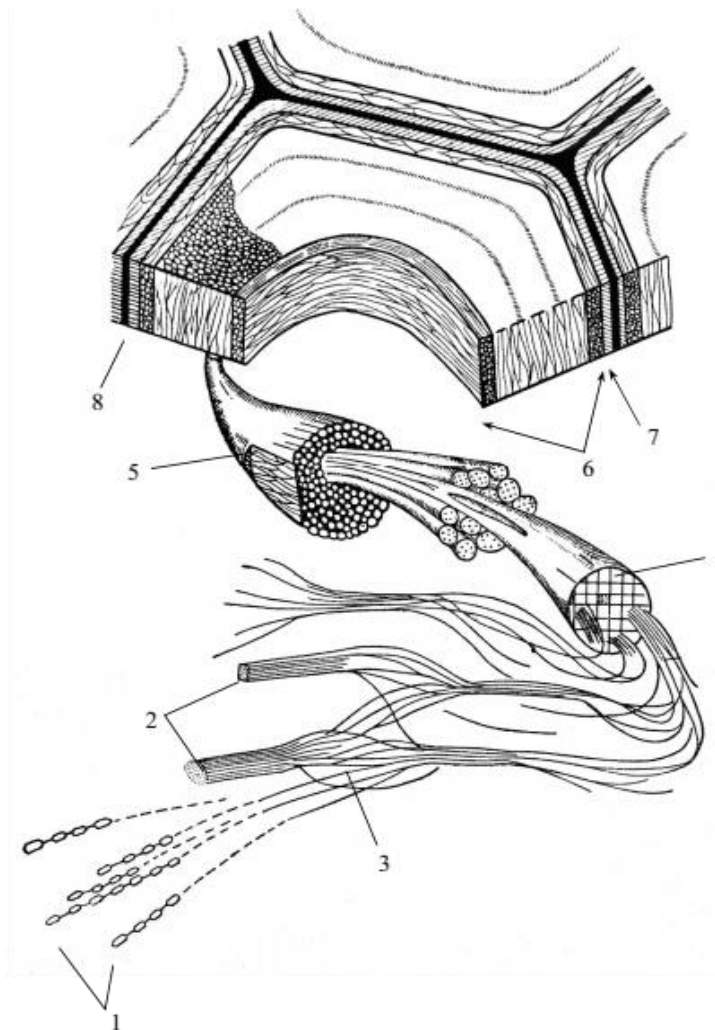


Рисунок 1 - Структура клеточной оболочки. 1 – молекулы целлюлозы; 2 – элементарные фибриллы (мицеллы); 3 – паракристаллический участок микрофибриллы; 4 – микрофибрилла; 5 – макрофибрилла; 6 – трехслойная вторичная оболочка; 7 – первичная оболочка; 8 – срединная пластинка (межклеточное вещество). [18]

В процессе экстракции из сырья с клеточной структурой можно выделить три основных стадии:

1. Пропитывание сухого растительного материала экстрагентом путем проникновения экстрагента в сырье и смачивание веществ, находящихся в сырье. Данный процесс происходит за счет капиллярных сил и, в связи с этим, носит название *капиллярной пропитки*. Растворитель проникает внутрь клетки по каналам, образованным кусочками измельченного растительного материала, по межклеточным ходам и ультрамикропорам, заполняет

клеточное пространство и вытесняет воздух, тем самым увеличивая площадь контакта экстрагента с сырьем.

2. *Растворение* компонентов растительной клетки с образованием концентрированного раствора тех веществ, которые могут быть растворены в данном экстрагенте, получившего название первичного сока. В то время как хорошо растворимые вещества десорбируются и растворяются в экстрагенте, другие набухают или пептизируются. Следует упомянуть, что наибольшее набухание растительного сырья вызывает вода. Набухание же под действием других экстрагентов зависит от их концентрации: чем она выше, тем набухание менее интенсивно. Кроме того, при использовании высококонцентрированных растворителей меньше раскрываются поры растительной оболочки и труднее происходит процесс экстракции.
3. *Переход растворенных веществ в экстрагент*. Процесс перехода вещества из одной фазы в другую носит название массообмена. Однако переход вещества возможен только из фазы с большей концентрацией в фазу с меньшей концентрацией, т.е. разность концентраций является основной движущей силой процесса массопередачи, или диффузии.

Механизм диффузии вещества через клеточную оболочку заключается в том, что молекулы диффундируемого вещества сорбируются из первичного сока материалом растительной стенки, диффундируют через нее и десорбируются с другой стороны перегородки, накапливаются в пограничном слое и перемещаются в растворитель (рисунок 2).

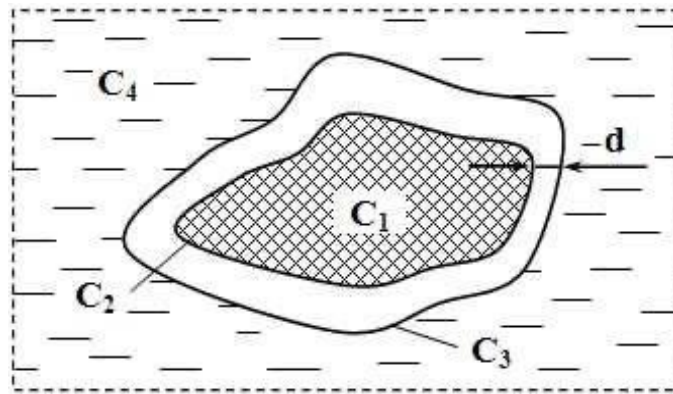


Рисунок 2 - Частица растительного материала в экстрагенте:

C_1 – концентрация экстрагируемых веществ внутри частицы; C_2 – концентрация экстрагируемых веществ на поверхности частицы; C_3 – концентрация экстрагируемых веществ на поверхности диффузионного пограничного слоя; C_4 – концентрация экстрагента в объеме, омывающем частицу; d – толщина диффузионного пограничного слоя. [14]

Концентрированный раствор вещества у границы раздела твердой и жидкой фаз называют пограничным слоем. Именно он существенно замедляет скорость массообменных процессов, влияя на разность концентраций: с увеличением пограничного слоя количество экстрагируемого вещества в жидкой фазе возрастает очень медленно, тогда как при малой его толщине скорость диффузии максимальна.

Скорость диффузии увеличивается с повышением температуры и уменьшается с увеличением вязкости среды и размера диффундирующих частиц.

Таким образом, процесс экстракции зависит от многих факторов: степени измельчения сырья, разности концентраций, температуры, вязкости экстрагента, времени экстрагирования [1, 17, 19].

Рассмотрим данные процессы более подробно.

1. *Степень измельчения сырья.* Для каждого вида лекарственного растительного сырья оптимальная степень измельчения и его характер зависят от анатомического строения и химического состава основополагающих растительных компонентов. Степень измельчения определяет поверхность

соприкосновения фаз, которая прямо пропорциональна скорости диффузии. Однако более тонкое измельчение не всегда приводит к наивысшей эффективности экстракции. Дело в том, что при чрезмерном измельчении сырье может слеживаться. Также увеличивается количество разорванных клеток, что приводит к выходу из клеток пектинов, белков и других высокомолекулярных веществ, в результате чего вытяжки получаются мутными. Именно по этим причинам существуют оптимальные степени измельчения растительного сырья: для листьев, цветков, травы это 3-5 мм; стебли, корни, кору принято измельчать до 1-3 мм, плоды и семена – до 0,3-0,5 мм. Этим можно добиться сохранения целостности клеточной структуры и максимизации протекания массообменных процессов.

2. *Разность концентраций.* Именно эта составляющая процесса массообмена является его движущей силой. Оптимизации поддержания достаточной ΔC можно добиться путем интенсивного перемешивания, заменой экстрагента, осуществлением противотока.
3. *Температура.* Согласно уравнению Эйнштейна температура прямо пропорциональна скорости экстракции. Однако данное утверждение на практике не всегда применимо (за исключением экстрагирования с помощью воды), так как летучие экстрагенты (такие как этиловый спирт, эфир) испаряются при высоких значениях T , что ведет к значительным потерям экстрагента. Кроме того, некоторые термолабильные БАВ разрушаются при сильном нагревании, что ограничивает интенсификацию процесса экстрагирования с помощью повышения температуры.
4. *Вязкость экстрагента.* Вязкость растворителя обратно пропорциональна скорости диффузии, то есть более вязкие экстрагенты, такие как растительные масла, требуют дополнительной интенсификации массопередачи (с помощью нагревания, перемешивания и т.д.).
5. *Время экстрагирования.* При увеличении времени экстрагирования количество извлеченных действующих веществ, как правило, повышается, при оптимальном соотношении всех вышеперечисленных факторов. Однако важно оценивать

экономическую целесообразность слишком длительного экстрагирования: иногда емкие трудо-, время- и энергозатраты несопоставимы с минимальным выигрышем выхода действующих веществ из сырья.

б. *Характер и структура растительного сырья, его пористость и порозность.*

Пористость сырья – это величина пустот внутри растительной ткани, которая определяет возможное количество образуемого внутреннего сока внутри растительной клетки. Порозность – это величина пустот между кусочками измельченного материала. Данные характеристики определяют скорость смачивания и набухания материала. Скорость набухания возрастает при предварительном вакуумировании сырья, а также при повышении давления и температуры.

Требования, предъявляемые к экстрагенту

Экстрагенты - соединения, используемые при экстракции растительных и биологических материалов. Экстрагент должен обладать способностью проникать через стенки клетки, избирательно растворять внутри клетки БАВ. Выбор экстрагента зависит от физико-химических свойств извлекаемого вещества, в том числе от степени гидрофильности. Для экстрагирования полярных веществ используют полярные растворители: воду, глицерин; в случае экстракции неполярных веществ – уксусную кислоту, хлороформ, эфир этиловый и другие мало- или неполярные органические растворители. Идеального растворителя для экстракции растительного сырья, отвечающего всем вышеперечисленным требованиям, пока нет. Комбинируя известные экстрагенты, можно получать растворители, которые будут обеспечивать избирательную экстракцию определенного вещества или комплекса веществ, отвечать требованиям пожаробезопасности, стабильности, устойчивости к микрофлоре и другим характеристикам [14].

1.2. Глубокие эвтектические растворители как современная альтернатива классическим экстрагентам

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 (рисунок 3). Температура плавления эвтектической композиции, как правило, значительно ниже, чем температуры плавления отдельных компонентов, что вызвано строением молекул веществ, входящих в ее состав, и особой надмолекулярной структурой образующихся связей. Эти взаимодействия приводят к уменьшению энергии, что выражается в снижении, иногда очень существенном, температуры плавления смеси. Хотя точная природа движущих сил для образования эвтектики не совсем понятна, нековалентные межмолекулярные взаимодействия между компонентами (такие как водородные связи и Ван-дер-Ваальсовы силы), предположительно, играют существенную роль.

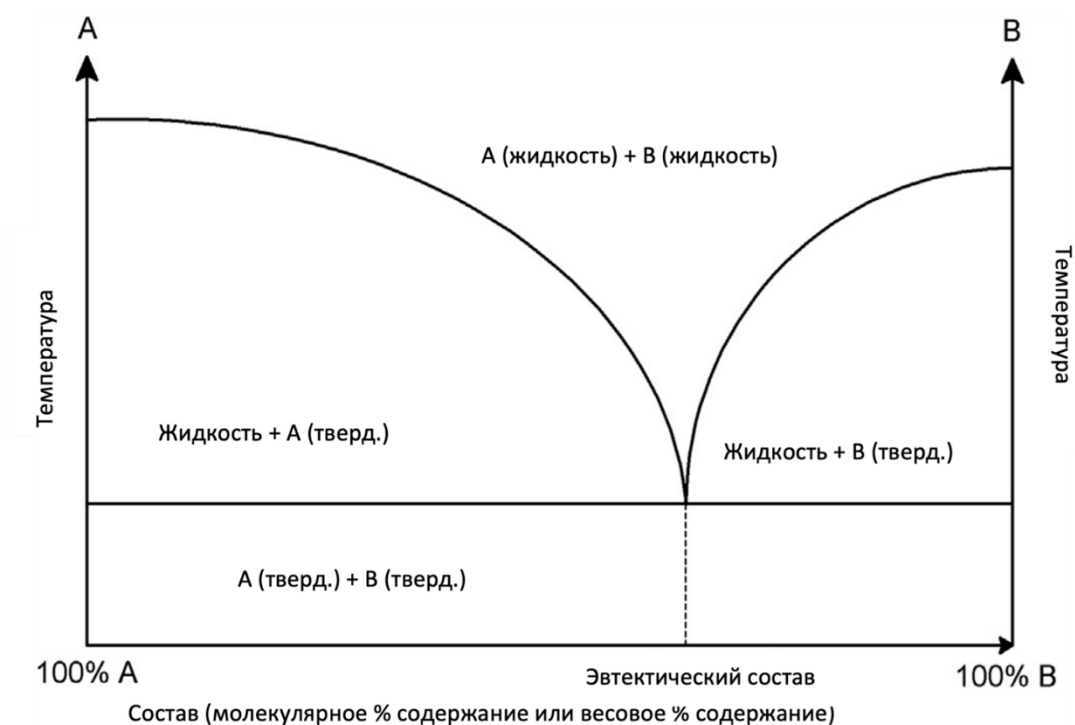


Рисунок 3 - Фазовая диаграмма бинарной эвтектической смеси [41]

Термин «Глубокий эвтектический растворитель» (ГЭР) был первоначально введен в обращение командой профессора А. Р. Abbott для описания любой смеси, характеризующейся значительным («глубоким») снижением температуры плавления по сравнению с индивидуальной температурой плавления веществ [23, 24]. Первые эвтектические жидкости были получены путем смешивания соли аммония с донором водородных связей (HBD). В большинстве случаев эвтектические жидкости стабильны при комнатной температуре или при температуре ниже 70 °С. Делокализация заряда, происходящая между молекулами донора и акцептора H⁺, является причиной значительного снижения температуры плавления исходных веществ. Также предполагается, что донор протонов действует как комплексообразователь, и при взаимодействии увеличивается эффективный размер молекул, что, в свою очередь, уменьшает T_{пл} смеси.

Эвтектические растворители могут быть представлены общей формулой R₁R₂R₃R₄N + X⁻ zY, где Y = R₅Z, Z = -CONH₂, -COOH, -OH, -NH₂.

Итак, некоторые чистые твердые химические вещества могут (почти самопроизвольно) становиться жидкими при нагревании и смешивании в определенных соотношениях. В 2011 году Choi et al. [33] впервые использовал новый термин «Глубокий эвтектический растворитель» (ГЭР) для описания категории жидкостей, присутствующих в растительных клетках. Действительно, было обнаружено, что многие первичные метаболиты (такие как сахара, аминокислоты или органические кислоты), находящиеся исключительно в твердом состоянии при физиологических температурах и стандартных значениях давления, могут стать жидкими при смешивании в определенных условиях (таблица 1).

Таблица 1 - Состав и молярные соотношения некоторых ГЭР

Двухкомпонентные ГЭР		Трехкомпонентные ГЭР	
Компоненты	Молярное отношение	Компоненты	Молярное отношение
Яблочная кислота : глюкоза	1 : 1	Яблочная кислота : холина хлорид : вода	1 : 1 : 2
Яблочная кислота : фруктоза	1 : 1	Яблочная кислота : аланин : вода	2 : 1 : 1
Яблочная кислота : сахароза	1 : 1	Пролин : яблочная кислота : вода	1 : 1 : 3
Бетаин : сахароза	2 : 1	Фруктоза : холина хлорид : вода	2 : 5 : 5
Глюкоза : фруктоза	1 : 1	Молочная кислота : глюкоза : вода	5 : 1 : 3
Лимонная кислота : глюкоза	2 : 1	Сахароза : холина хлорид : вода	1 : 4 : 4
Пролин : глюкоза	1 : 1	Глюкоза : холина хлорид : вода	2 : 5 : 5

В настоящее время идентифицировано и охарактеризовано как ГЭР более ста комбинаций твердых веществ (состоящих из двух или более соединений), образующих жидкости при смешении [36, 69]. Хотя их точная роль и присутствие в живых клетках все еще изучаются, авторы предположили, что в живых организмах ГЭР могут быть альтернативной средой, замещающей воду и липиды, что может объяснить многочисленные биологические процессы, такие как биосинтез или хранение различных нерастворимых в воде метаболитов и макромолекул. Эта гипотеза была основана на наблюдении, что многие из этих молекул присутствуют в одинаковых количествах во всех типах клеток и организмов. Например, нектар цветов имеет состав, сходный с составом ГЭР (фруктоза : глюкоза : сахароза). То же самое наблюдение можно сделать в отношении компонентов, содержащихся в меде (глюкоза и фруктоза), в пустынных растениях рода *Selaginella*, в микроорганизмах и различных других организмах. Многие вторичные метаболиты растений не растворимы в воде, но синтезируются, хранятся и транспортируются в растительных клетках. Таким образом, эта новая жидкая фаза может быть вовлечена в биотрансформацию плохо растворимых в воде веществ, в которой могут находиться как субстраты, так и ферменты. Это предположение подкрепляется и исследованием Y. Dai, которое посвящено растворению биоактивных молекул и активности/стабильности ферментов в ГЭР. Было проведено несколько

экспериментов для изучения солюбилизирующей способности ГЭР [37]. Результаты показали, что некоторые натуральные продукты (такие как рутин, кверцетин, коричная кислота, картамин, гинкголид В) растворимы в ГЭР в 18 - 460 000 раз лучше по сравнению с водой. Кроме того, присутствие в среде ГЭР может способствовать обеспечению стабильности и активности ферментов. Это объясняется тем, что в таких смесях образуется большая и прочная сеть водородных связей, которая снижает внутреннюю активность компонентов. Одним из примеров является тот факт, что водный раствор мочевины обладает денатурирующими свойствами, в то время как эвтектическая смесь мочевины с холина хлоридом не проявляет подобных свойств [40]. Было обнаружено, что компоненты ГЭР образуют нековалентный комплекс, который ограничивает их диффузию в ядро белка [64, 87]. ГЭР образуют водородные связи с активными группами на поверхности фермента, что, вместо денатурации липазы, приводит к большей стабильности белка. Многочисленные ферменты были изучены в таких системах и продемонстрировали как высокую активность, так и неожиданную многообещающую стабильность: эпоксидгидролазы [45, 55], протеазы, такие как субтилизин и α -химотрипсин [59, 91], эстеразы и липазы [44, 90]. С другой стороны, ряд ГЭР способен оказывать и противоположное действие на ферменты: был продемонстрирован ингибирующий эффект ГЭР на основе холина хлорида и аминокислот по отношению к присущей почти всем высшим организмам ацетилхолинэстеразе, ключевому ферменту процесса холинергической нейротрансмиссии, содержащемуся в синапсах и катализирующему гидролиз нейромедиатора ацетилхолина до холина и остатка уксусной кислоты, что ведет к прекращению импульсной нейротрансмиссии [93]. Очевидно, что необходимы дополнительные эксперименты, чтобы подтвердить утверждение о том, что ГЭР участвуют в путях биосинтеза в живых организмах.

Кроме того, ГЭР также могут принимать участие в механизмах защиты и выживания организмов в экстремальных условиях, таких как засуха (например, у кактусов, суккулентов, лишайников, прокариот) или чрезмерно низкая

температура (для семян, прокариот). Было показано, что, когда вода входит в состав ГЭР, она прочно удерживается в его составе и не может быть легко испарена [33]. Таким образом, образование ГЭР с участием молекул воды может быть стратегией для организмов по ее удержанию в клетке. Предположительно, живые организмы образуют ГЭР для хранения и защиты биологически активных соединений или необходимых молекул. Например, в семенах ячменя было обнаружено большое количество сахарозы и холина в эписперме во время покоя, что, возможно, является способом хранения веществ путем образования ГЭР. Также была исследована стабилизирующая способность ГЭР для нестабильных в водной среде фенольных соединений. Результаты показали, что натуральные пигменты из сафлора более стабильны в ГЭР, чем в воде. Кроме того, в многочисленных работах сообщалось о значительном снижении термодинамической активности компонентов, образующих эвтектические растворители, что отражается в их очень низкой электрофильной или нуклеофильной реакционной способности [41, 45]. Таким образом, молекулы, образующие эту новую жидкую фазу, связаны друг с другом через хорошо организованную трехмерную систему с оптимальными взаимодействиями через межмолекулярные и внутримолекулярные водородные связи. ГЭР ведет себя как новая субстанция, обладающая свойствами, которые могут отличаться от свойств чистых молекул. Однако, несмотря на это, сеть водородных связей сохраняет открытые промежутки, позволяющие растворять различные вещества. То есть любая молекула, макромолекула или ион, которые способны образовывать ассоциаты внутри этой матрицы, будут высоко растворимы и прочно связаны. Можно предположить, что ГЭР могут образовываться не только в различных органеллах, таких как пластиды и везикулы, но и прикрепляться к белковым агрегатам или клеточным мембранам. Исследования в данной области активно продолжаются.

Также важно подчеркнуть, что в отличие от обычных растворителей, ГЭР состоят по меньшей мере из двух молекулярных частиц. ГЭР могут быть охарактеризованы как полимер с нековалентными взаимодействиями между

веществами. Хотя межмолекулярные силы в этих смесях относительно сильны, энергия, необходимая для диссоциации молекул, все же слабее, чем для диссоциации ковалентных связей. Следовательно, ГЭР, в отличие от обычных молекулярных растворителей, могут проявлять совершенно другие характеристики при разбавлении или смешивании с другой жидкостью. По этой причине можно утверждать, что ГЭР не может существовать в сильно разбавленной среде и что наблюдаемые результирующие эффекты эвтектической смеси на самом деле являются следствием комбинированного действия каждого отдельного компонента ГЭР. Действительно, значительное содержание воды может разрушить межмолекулярную связь ГЭР, и каждый компонент восстановит свои собственные свойства. Одно из ^1H ЯМР исследований [46] показало, что разбавление DES в воде может привести к разрыву супрамолекулярных комплексов, характерных для эвтектических смесей. При таком разбавлении ГЭР имеет тенденцию превращаться в простой раствор своих отдельных аналогов, что является нежелательным событием, поскольку некоторые из вышеупомянутых характеристик, которым обладают ГЭР в нативном состоянии, могут быть утеряны. Аналогичная работа с некоторыми ГЭР показала, что взаимодействия между компонентами ослабляются при разбавлении водой и разрушаются при содержании воды выше 50% (v/v) [38]. С другой стороны, иные эксперименты [51, 86] продемонстрировали, что присущие ГЭР свойства (оцениваемые по влиянию на активность/стабильность фермента или по токсичности для пресноводных животных) в водном растворе остаются неизменными или, по крайней мере, полностью отличаются от соответствующего водного раствора отдельных компонентов. Обширная сеть водородных связей в ГЭР, по-видимому, достаточно прочна, чтобы предотвратить полную диссоциацию ГЭР в водном растворе. Таким же образом доказано, что некоторые ГЭР (в зависимости от состава и концентрации) обладают антибактериальным свойством и проявляют ингибирующее действие на микроорганизмы [47, 48, 86]. Что интересно, данные исследования выявили более высокую цитотоксичность эвтектической смеси по

сравнению с отдельными компонентами. Механизм, объясняющий повреждающее действие ГЭР на микроорганизмы, может быть связан с их влиянием на клеточные мембраны. Эта большая антибактериальная активность ГЭР по сравнению с таковой у их отдельных компонентов может быть объяснена делокализацией заряда через водородную связь между акцептором и донором протона, механизмом, аналогичным антимикробной активности хорошо наблюдаемых делокализованных липофильных катионов [63, 80].

Факторы, влияющие на извлечение флавоноидов с использованием ГЭР

Тщательное изучение современной литературы, касающейся экстракции флавоноидов с использованием ГЭР [76], выявляет ряд факторов, оказывающих наибольшее влияние на выход действующих веществ при экстракции: температура, молекулярная структура и состав ГЭР, время экстракции, содержание воды, соотношение сырье : экстрагент и рН.

1. Температура

Ожидается, что температура, при которой происходит экстракция, повлияет на время экстракции, а также на ее эффективность и производительность. Как правило, более высокие температуры повышают молекулярную подвижность и позволяют молекулам действующих веществ быстрее диффундировать в растворитель. Процесс экстракции с помощью ГЭР не является исключением. Более того, экстракция с помощью ГЭР имеет даже более высокую зависимость от температуры из-за необходимости снижения вязкости ГЭР, которая значительно влияет на скорость процесса. Согласно данным литературы, приемлемый температурный диапазон для экстракции составляет от комнатной температуры (25 °С) до примерно 60 °С. Более высокие температуры, помимо того, что требуют дополнительного расхода энергии для поддержания (отказ от экологически чистого характера экстракции), также могут поставить под угрозу целостность структуры либо самого ГЭР и его компонентов с выделением нежелательных побочных соединений, либо

целевого вещества, поскольку многие из биологически активных соединений термолабильны [65]. Оказалось, что очень высокие температуры экстракции в некоторых случаях могут уменьшать выход из-за снижения способности к взаимодействию между целевым соединением и выбранным экстрагентом, независимо от термической стойкости любого из них [34].

2. Молекулярная структура и состав ГЭР

Молекулярная структура ГЭР – характеристика, обуславливающая его уникальные свойства. Для достижения максимального выхода полярность используемого ГЭР должна быть близка к полярности целевого вещества. Среди аналогичных ГЭР тот, полярность которого ближе к целевой, будет обладать наибольшей эффективностью. Поэтому при выборе подходящего ГЭР для экстракции сходство полярности является главным приоритетом с точки зрения эффективности. Подбор оптимального состава ГЭР может представлять сложность, учитывая множество потенциальных структур данных экстрагентов, но потенциально обеспечивает большие перспективы в достижении максимального выхода действующих веществ благодаря созданию новых структур, которые приближаются к полярности каждого целевого соединения [62, 89].

Кроме того, необходимо учитывать молекулярные взаимодействия как донора (HBD), так и акцептора (HBA) протона с мишенью, а также с фоновыми веществами. Любые конкурентные взаимодействия между ингредиентами ГЭР и другими компонентами системы могут в значительной степени повлиять на эффективность экстракции, потенциально приводя к перепроектированию всего процесса [75, 85]. Данный пример представлен в работе Cui и соавторов, где изменение соотношения между донором и акцептором водородной связи приводило к снижению выхода. Это снижение было вызвано не изменением полярности или какого-либо внешнего фактора, а присутствием хлорид-аниона, который несли и холин, и бетаин и который реагировал с мишенью. Уменьшение его присутствия в ГЭР снижало выход только из-за уменьшения количества

взаимодействий между хлорид-анионами и целевым соединением [34]. В более общем плане, что касается соотношения НВА/НВД, представляется, что увеличение содержания донора водородной связи приводит к снижению вязкости ГЭР. Кроме того, увеличение гидроксильных групп в любом ингредиенте ГЭР будет способствовать образованию водородных связей, что приведет к значительно более стабильной структуре ГЭР [62].

3. Вязкость

Обычно высокая вязкость ГЭР является основным ограничением их использования в качестве экстрагентов, поскольку это препятствует проникновению ГЭР в используемую матрицу. Повышение температуры процесса экстракции может привести к снижению вязкости, однако этот вариант не всегда приемлем, так как, во-первых, он требует повышения энергозатрат, и, во-вторых, некоторые термочувствительные БАВ могут разрушаться при повышенной температуре.

Простым способом преодоления этой проблемы является добавление соразтворителя в экстракционную среду. В большинстве случаев этим соразтворителем является вода, которая сохраняет экологичность процесса. Таким образом, снижается вязкость и облегчается экстракция [27, 74].

Однако количество добавленной воды в ГЭР является фактором, который следует тщательно контролировать. Dai и соавторы [38] показали, что при добавлении более 50 % воды к ГЭР структура водородных связей между его компонентами может разрушаться.

Другой подход к преодолению проблемы высокой вязкости заключается в использовании огромного количества возможных комбинаций природных соединений, которые могут образовывать ГЭР, для создания растворителей с низкой вязкостью. В исследованиях Magucho и соавторов [42, 43, 73] была введена новая концепция — разработка менее полярных ГЭР с более низкой вязкостью, образующихся путем смешивания жирных кислот с разной длиной

алкильной цепи или путем объединения ментола с различными органическими кислотами.

4. Время извлечения

Время экстракции – еще один важный фактор в аспекте применения ГЭР. Большее время экстракции увеличивает трудо- и энергозатраты, в то время как более короткое время процесса сопряжено с риском оставления значительных количеств целевых веществ в образце, что делает процесс неэффективным. В большинстве рассмотренных литературных источников описаны экстракции с временем извлечения от 20 минут до 2 часов. Конечно же, тип экстракции также определяет необходимое время экстракции, при этом энергетические методы, такие как нагрев, ультразвук или микроволновая печь, требуют меньшего времени, но, в свою очередь, больше энергии для осуществления. В целом, использование ГЭР, несомненно, позволяет сократить время экстракции для всех используемых методов.

5. Соотношение сырье : экстрагент

Соотношение образца (твердого или иного) к используемому растворителю также может повлиять на экстракцию. Использование небольшого количества растительного материала по отношению к растворителю означает, что экстракция может быть неэффективной в больших масштабах, поскольку в данный момент времени обрабатывается только небольшое количество материала. С другой стороны, применение систем с большим количеством растительного материала и малым – экстрагента может означать, что диспергирование растворителя вокруг образца будет происходить медленнее, поверхность контакта материала с экстрагентом может уменьшиться (по сравнению с меньшим количеством образца), и система в конечном итоге будет работать неэффективно. В большинстве литературных источников, после статистического анализа или изучения предыдущих успешных работ, устанавливалось соотношение твердой фазы к растворителю 1:10, однако,

конечно же, данный параметр зависит от конкретного ГЭР и используемого растительного материала [81, 82].

6. pH

Уровень pH системы в некоторых случаях может определять форму присутствия целевого соединения в растворе, что в конечном итоге влияет на его растворимость в ГЭР. pH также может влиять на некоторые компоненты ГЭР, изменяя их полярность или общее поведение, что приводит к положительным или нежелательным результатам. Ионная форма присутствия БАВ (результат pH) может полностью изменить ход процесса экстракции, чем первоначально планировалось [54, 88].

Кроме того, важную роль играет и сама структура выделяемых БАВ. Так, например, для флавоноидов, которые обладают слабокислой средой, предпочтительна экстракция с применением слабощелочного или нейтрального ГЭР.

Токсичность

Данные литературы, касающиеся токсичности ГЭР, все еще скудны и немногочисленны, и в большинстве опубликованных работ, связанных с их использованием в качестве экстрагентов, тесты на токсичность не включены.

Наууан и соавторы [47] были одними из первых, кто изучали токсичность и цитотоксичность ГЭР. Протестированные ГЭР и их отдельные компоненты не проявляли токсичности в отношении *Bacillus subtilis*, золотистого стафилококка, кишечной палочки или синегнойной палочки. Интересным открытием было то, что исследуемые ГЭР проявляли значительно более высокую цитотоксичность, чем их отдельные компоненты, в отношении личинок *Artemia salina*. Это поразительное различие в цитотоксичности было приписано сети водородных связей, присутствующей в ГЭР, и, безусловно, заслуживает дальнейшего изучения.

Токсичность серии ГЭР против фибробластоподобных клеток L929 была изучена Duarte, Paiva и соавторами [67]. Результаты показали высокую ингибирующую активность ГЭР на основе холина хлорида и винной кислоты в отношении фибробластоподобных клеток. Авторы пришли к выводу, что присутствие органических кислот как доноров водородных связей приводит к повышению цитотоксической активности. В другой работе серия из 28 ГЭР, содержащих холина хлорид в качестве акцептора водородных связей и различные доноры водородных связей, была протестирована на их цитотоксичность в отношении клеток почек эмбриона человека (HEK-293) [26]. Результаты показали, что отдельные компоненты ГЭР (холина хлорид, а также соединения, используемые в качестве доноров H^+), были менее токсичными, чем соответствующие образованные ими ГЭР, и что структура HBD и соотношение HBA/HBD играют роль в цитотоксичности.

Radošević и соавторы [70, 72] изучали различные ГЭР в отношении их антимикробной активности в отношении *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, золотистого стафилококка и *Candida albicans*, а также их цитотоксичности в отношении нормальных и раковых линий клеток человека (HEK293T, HeLa, MCF-7). Было обнаружено, что ГЭР, содержащие органическую кислоту, обладают хорошей антимикробной активностью, в то время как их отдельные компоненты не обладали подобными свойствами. Более того, экстрагент на основе холина хлорида и щавелевой кислоты проявлял цитотоксичность в отношении раковых клеток. Также ученые оценивали цитотоксичность ГЭР [72] на основе холина хлорида (донорами водородных связей выступали глюкоза, глицерин и щавелевая кислота) и их отдельных компонентов на жизнеспособность и морфологию клеток яичников канального сомика (ССО) и опухолевых клеток MCF-7 человека. Было показано, что ГЭР на основе холина хлорида и щавелевой кислоты оказывал цитотоксическое действие на обе клеточные линии, как и сама щавелевая кислота индивидуально, что было объяснено образованием кристаллов оксалата кальция в клетках и значительным снижением значений pH среды. В другой

работе те же авторы продемонстрировали повышенную по сравнению с составляющими компонентами токсичность ГЭР на основе холина хлорида и малоновой кислоты, причем данная характеристика определялась также молярным соотношением донора и акцептора H^+ [71].

В работе Mascario и соавторы [58] были изучены свойства ГЭР, состоящих из различных доноров и акцепторов водородных связей, на предмет их цитотоксичности в отношении двух линий клеток кожи человека, HaCaT32-35 и MNT-136-38. Тенденции токсичности ГЭР различались в зависимости от использованных компонентов, поэтому их не следует считать безопасными для дальнейшего применения.

Интересным является и то обстоятельство, что токсикологический профиль ГЭР зависит не только от качественного состава (и основную роль, по мнению многих исследователей, играет именно вид донора протонов), но и от молярного соотношения компонентов, а также вязкости каждого конкретного ГЭР [60]. Механизм цитотоксического действия остается до конца неясным, но существуют предположения о возможном взаимодействии ГЭР с фосфолипидами клеточных мембран, что ведет к их дезинтеграции и повреждению клеток. Другим объяснением может служить аккумуляция и агрегация ГЭР внутри клеток. Интересен эксперимент Mbous и соавторов, в котором была продемонстрирована цитотоксичность ГЭР на основе холина хлорида : глюкозы (2 : 1) и холина хлорида : фруктозы (2 : 1) по отношению к пяти опухолевым клеточным линиям (HelaS3, PC3, A375, AGS, MCF-7) и одной линии здоровых гепатоцитов человека (WRL-68) [61]. Полученные авторами данные ($EC_{50} = 98-516$ мМ) говорили о вредоносном воздействии данных ГЭР. Важно и то, что ГЭР проявляли значительную цитотоксичность по отношению к применяемой нераковой клеточной линии (WRL-68) ($EC_{50} = 112$ и 185 мМ, соответственно для фруктоза - и глюкоза - содержащих ГЭР), что указывает на потенциальное токсическое действие данных эвтектических смесей на здоровые клетки. Исследуемые ГЭР увеличивали проницаемость мембран и в

значительной мере повышали окислительный стресс в клетках после 24 ч воздействия.

Безопасность ГЭР *in vivo* изучена гораздо меньше. Первым опубликованным исследованием, в котором была проведена токсичность ГЭР как *in vitro*, так и *in vivo*, является работа Наууан и соавторов 2015 года [49]. Четыре ГЭР были протестированы против пяти линий раковых клеток человека и одной линии нормальных клеток, а также были проверены на предмет цитотоксичности их отдельные составные компоненты. Было обнаружено, что цитотоксичность ГЭР в различных клеточных линиях является значительной, и соотношение НВА/НВД, а также структура НВД, по-видимому, играют важную роль в токсичности. Исследования острой токсичности *in vivo* на мышах при внутрижелудочном введении показали, что исследованные ГЭР были более токсичными, чем их отдельные компоненты, более того, ГЭР на основе холина хлорида и мочевины в мольном соотношении 1 : 3 вызывал немедленную смерть экспериментальных животных. ГЭР на основе холина хлорида и мочевины в другом мольном соотношении компонентов (холина хлорид : мочевина = 1 : 2) также оказался токсичным. Полученные данные указывают на синергический токсический эффект эвтектических смесей после приготовления.

Mbous и соавторы [61] провели эксперимент по изучению острой токсичности ГЭР на основе холина хлорида : глюкозы (2 : 1) и холина хлорида : фруктозы (2 : 1); исследования проводили на мышах. Животных разделили на четыре группы: первой группе вводили чистую воду, второй – высокую дозу (20 г/кг) соответствующего ГЭР, третьей – среднюю (10 г/кг) и четвертой – низкую (5 г/кг). Токсическое действие ГЭР было доказано: установлена средняя летальная доза LD50 (1,84 и 1,24 г/мл для холина хлорида : глюкозы (2 : 1) и холина хлорида : фруктозы (2 : 1) соответственно), кроме того, на основании биохимического анализа крови, показано опасное воздействие ГЭР на печень (так, уровень аспаратаминотрансферазы (АСТ) у мышей группы ГЭР был повышен примерно в 10 раз). Однако не до конца ясен путь введения ГЭР.

Авторы предполагают, что, возможно, большой вклад в профиль токсичности вносит вязкость ГЭР [61].

Токсикологические исследования ГЭР обязательно должны быть проведены до утверждения о возможности их дальнейшего применения в качестве экстрагента. В этом контексте Chen и соавторы [32] провели исследование острой токсичности для проверки безопасности ГЭР на основе холина хлорида и глицерина. Было показано, что значение LD50 (средняя смертельная доза) тестируемого ГЭР составило 7733 мг/кг с 95% доверительным интервалом 7130-8387 мг/кг для перорального введения.

Небольшое количество других исследований посвящены изучению токсичности ГЭР у крыс [77, 78]. Velebna с коллегами [30] опубликовали оценку токсичности экстракта из зеленых кофейных зерен, богатого полифенольными соединениями. Экстрагентом выступал ГЭР, состоящий из бетаина и глицерина (молярное соотношение 1:2, содержание воды \approx 10%). Исследования проводились *in vivo* на крысах. Пероральное введение полученного экстракта вызвало смерть двух животных из шести, а у других возникли побочные эффекты (такие как уменьшение питания, чрезмерное потребление воды, потеря веса и жировой ткани, гепатомегалия, окислительный стресс в плазме и повышение уровня липидов в крови). Данные результаты ограничивают дальнейшее применение экстрактов на основе ГЭР.

Одна из последних работ [53] проливает свет на механизмы токсичности ГЭР. Группа авторов из Кореи изучала цитотоксический профиль 8 ГЭР на основе холина хлорида и различных доноров водородной связи. Детальное исследование было посвящено ГЭР на основе холина хлорида и мочевины в молярном соотношении 1 : 2, действие которого было продемонстрировано как *in vitro*, так и *in vivo*. Данная эвтектическая смесь показала свои цитотоксические свойства на различных клеточных линиях. Более того, острая токсичность 50 % водного раствора данного ГЭР была доказана в эксперименте при пероральном введении мышам: так, доза 2,5 г/кг приводила к гибели 100 % животных, при уменьшении дозы наблюдались побочные эффекты. Данный факт исключает

возможность объяснения токсичности ГЭР лишь их повышенной вязкостью. Необходимо добавить, что введение мышам растворов индивидуальных веществ (холина хлорида, мочевины), а также простого водного раствора смеси составляющих не вызывало подобных эффектов. После изучения метаболического профиля животных группы ГЭР исследователи пришли к заключению, что пероральный прием раствора эвтектической смеси приводил к возникновению окислительного стресса, росту уровня аммиака в крови и дисбиозу кишечника. Аммиачный стресс, с одной стороны, может быть объяснен образованием NH_3 как побочного продукта при синтезе ГЭР тепловым методом (из-за нагревания и распада мочевины), и, с другой стороны, повышенной проницаемостью клеток кишечника из-за воздействия на них ГЭР (из-за нарушения целостности мембран при связывании эвтектическим надмолекулярным комплексом фосфолипидов), так как возрастание концентрации аммония наблюдалось и при изготовлении ГЭР нетепловыми методами, а также при синтезе ГЭР на основе холина хлорида, не содержащих мочевины в качестве донора водородной связи.

Таким образом, на сегодняшний день исследований влияния ГЭР на организм человека и животных недостаточно. Следовательно, на данный момент использование их в качестве среды для БАВ неприменимо, и после осуществления процесса экстракции необходимо удаление глубокого эвтектического растворителя, который в дальнейшем может использоваться для экстракции повторно [12].

Методы удаления экстрагента

Эффективное решение для отделения БАВ от компонентов ГЭР включает использование колоночной хроматографии через насадочную колонку с макропористой смолой, которую очищают деионизированной водой, а затем после выдержки экстракт элюируют водным этанолом. Этот способ, однако, требует дальнейшей обработки раствора для выделения конкретного соединения из потенциальной группы действующих веществ, экстрагированных из

источника. Метод насадочной колонны может обеспечить исключительно высокие выходы - до 98,92% [92].

Обратная экстракция с использованием антирастворителя является более простым методом выделения БАВ из ГЭР. После центрифугирования образца надосадочную жидкость разбавляют органическим антирастворителем и затем снова центрифугируют для создания двухфазной системы. Вновь образующийся супернатант является целевой системой, оставляя только растворитель для выпаривания (т.е. путем вакуумного центробежного выпаривания [56]).

Существует и более высокотехнологичный способ извлечения биологически активных соединений из ГЭР - имитация денатурации ДНК в ГЭР, приведенный в работе Tian и соавторов [83]. Согласно их исследованиям, основной целью извлечения БАВ из ГЭР является разрушение водородных связей, которые удерживают ГЭР вместе, что является процессом, аналогичным денатурации. Группа разработала эффективный метод извлечения флавоноидов на металлическом хромовом органическом каркасе (Материалы Института Лавуазье: MIL-100 (Cr)), из которого выделение действующих веществ (в данном случае флавоноидов) становится более легким и селективным. Первоначально ГЭР разводят в воде (10% раствор ГЭР), затем добавляют NaCl, что приводит к разрушению существующих водородных связей. Последующее добавление MIL-100 (Cr) позволяет отделяемым флавоноидам присоединяться к нему и легко удаляться из разбавленного ГЭР.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 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).

Выявлено, что концентрированный раствор вещества у границы раздела твердой и жидкой фаз замедляет скорость массообменных процессов, влияя на разность концентраций: с увеличением пограничного слоя количество экстрагируемого вещества в жидкой фазе возрастает очень медленно, тогда как при малой его толщине скорость диффузии максимальна.

Также были изучены современные данные о глубоких эвтектических растворителях, механизме их образования, их свойствах и характеристиках, токсикологическом профиле.

Одним из изучаемых способов экстракции является применение ГЭР в качестве экстрагентов, обладающих высокой селективностью. Выбор состава ГЭР определяется структурой БАВ, которые необходимо выделить, что позволяет применять уникальный экстрагент в каждом конкретном случае. Экспериментальный подбор наилучшего состава ГЭР, оптимальной степени его вязкости, изучение его свойств, а также оптимизация условий экстрагирования являются необходимыми этапами исследования.

Показано влияние значений рН, определяющих в некоторых случаях форму присутствия целевого соединения в растворе и полярность.

Установлено, что ГЭР обладают токсическим действием на организм, превышающим простой суммарный токсикологический профиль их компонентов. Причиной токсичности ГЭР могут служить их качественный состав (входящие в состав ГЭР вещества), молярное соотношение компонентов, вязкость.

ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования, материалы и реагенты

Объектом исследования являлась четырехкомпонентная растительная композиция, состоящая из следующих видов лекарственного растительного сырья: *Herba Leonuri* - травы пустырника (ФС.2.5.0034.15 «Пустырника трава»), *Hyperici herba* - травы зверобоя (ФС.2.5.0015.15 «Зверобоя трава»), *Melissae officinalis herba* – травы мелиссы лекарственной (ФС.2.5.0084.18 «Мелиссы лекарственной трава»), *Thymi serpylli herba* – травы чабреца (ФС.2.5.0047.15 «Чабреца трава»). Лекарственное растительное сырье было доставлено из Северо-Кавказского филиала Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР) и высушено воздушно-теневым способом. Все компоненты растительной композиции отвечали требованиям нормативной документации.

В работе применялись следующие вещества и реагенты: холина битартрат ($M_w = 253,25$) и бетаина гидрохлорид ($M_w = 153,61$) получены из Suzhou Vitajoy Biotech Co., Китай, яблочная кислота ($M_w = 134,1$) доставлена из Anhui Sealong Biotechnology, Китай, холина хлорид ($M_w = 139,62$), молочная кислота ($M_w = 90,08$), лимонная кислота ($M_w = 192,1$), щавелевая кислота ($M_w = 90,04$), мочевины ($M_w = 60,06$), глюкоза ($M_w = 180,16$), фруктоза ($M_w = 180,16$), пропиленгликоль ($M_w = 76,09$), ПЭГ-400 ($M_w = 380-420$), глицерин ($M_w = 92,09$) и порошок рутина ($\geq 94,0\%$) предоставлены компанией Sigma Aldrich, Китай, алюминия хлорид получен от PanReas AppliChem, спирт этиловый 96% - от ООО «Константа-Фарм М», кислота уксусная ледяная – от компании «АльфаХим».

2.2. Методы фармакогностического анализа

Макро- и микроскопический анализ проводили согласно положениям ГФ XIV издания. Макроскопический анализ растительной композиции проводили визуально невооруженным глазом и с помощью лупы (x10) и бинокля.

стереоскопического МИКРОМЕД МС-1 (х10-х30) согласно методикам ГФ XIV издания (ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы», ОФС.1.5.1.0003.15 «Листья», ОФС.1.5.1.0004.15. «Цветки», ФС.2.5.0015.15 «Зверобоя трава», ФС.2.5.0034.15 «Пустырника трава», ФС.2.5.0047.15 «Чабреца трава», ФС.2.5.0084.18 «Мелиссы лекарственной трава»). Микроскопический анализ проводился в соответствии с ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» на микроскопе «МИКМЕД – 6» (окуляр 10х и объективы: 4х, 10х, 40х), фотоснимки выполнены с помощью цифровых камер Canon A 3100 IS и Canon Digital IXUS 80 IS.

2.3. Физико-химические методы анализа

2.3.1. Метод спектрофотометрии

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.

Методика количественного определения суммы флавоноидов, извлекаемых 70 %-ым этиловым спиртом в качестве экстрагента, в пересчете на рутин в экспериментальной растительной композиции:

Около 2 г (точная навеска) исследуемого сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 24 мл 70 % этилового спирта, колбу закрывают пробкой. Затем колбу нагревают при температуре 60 °С в течение 1 ч, содержимое перемешивают с помощью магнитной мешалки. Колбу

охлаждают до комнатной температуры, содержимое колбы фильтруют, получая раствор А. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 1 мл раствора А, 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 5 % и доводят объем раствора спиртом 70 % до метки.

Через 40 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А и 1 мл уксусной кислоты разведенной (30 %), доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность испытуемого раствора А;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм;

V – объем экстрагента, мл;

a – навеска сырья, в граммах;

W – влажность сырья, в процентах.

Методика 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:

Около 2 г (точная навеска) исследуемого сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 30 мл 50 %-ого водного раствора полученного ГЭР, колбу закрывают пробкой. Затем колбу нагревают при температуре 60 °С в течение 1 ч, содержимое перемешивают с помощью магнитной мешалки. Колбу охлаждают до комнатной температуры, содержимое колбы фильтруют, получая раствор А. В мерную колбу вместимостью 25 мл

помещают 1 мл раствора А, 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 5 % и доводят объем раствора спиртом 70 % до метки.

Через 40 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А и 1 мл уксусной кислоты разведенной (30 %), доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a \cdot 1 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность испытуемого раствора А;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм;

V – объем экстрагента, мл;

a – навеска сырья, в граммах;

W – влажность сырья, в процентах.

Испытания проводят относительно стандартного образца рутина:

Около 0,01 г СО рутина (точная навеска) растворяют в мерной колбе на 100 мл в 80 мл 70% этилового спирта, затем доводят до метки тем же растворителем (раствор А). 5 мл раствора А добавляют в колбу на 25 мл, добавляют 5 мл 5% раствора алюминия хлорида спиртового и доводят до метки 70% этиловым спиртом.

Через 40 мин измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 410 нм (диапазон 350-500 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 5 мл раствора А и 1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, доведенный спиртом 70 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Приготовление 5 % раствора алюминия хлорида.

В плоскодонную коническую колбу с притёртой пробкой вместимостью 200 мл помещают 5 г алюминия хлорида, прибавляют 100 мл этилового спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора один месяц.

2.3.2. Метод спектрометрии в инфракрасной области

Подготовку образца осуществляли согласно следующим методикам 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.

2.3.3. Метод ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

Ультраэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (УЭЖХ-МС/МС, Ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) – современный и высокочувствительный метод качественного анализа компонентов исследуемого образца. Жидкостная хроматография позволяет разделить смеси нескольких веществ, тогда как масс-спектрометрия создает возможность для оценки структуры фрагментов молекул веществ с высокой точностью.

Ультраэффективная жидкостная хроматография представляет собой вариант жидкостной хроматографии, отличающийся большей эффективностью по сравнению с классической высокоэффективной жидкостной хроматографией. Особенностью ультраэффективной жидкостной хроматографии является меньшее время анализа и большая эффективность хроматографического разделения.

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 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»).

Пробоподготовка образцов:

1. Пробоподготовка образца извлечения, полученного с применением в качестве экстрагента 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 (ГЭР-23):

В эппендорф поместили 0,5 мл спирта этилового, добавили 0,5 мл экстракта, перемешали, центрифугировали в течение 30 мин при 14000 об/мин, отобрали супернатант в новый эппендорф и центрифугировали в течение 30 мин при 14000 об/мин, супернатант перенесли в хроматографическую виалу.

2. Пробоподготовка образца извлечения, полученного с применением в качестве экстрагента 70 %-ого этилового спирта:

Образец использовался без пробоподготовки. Центрифугировали 30 мин при 14000 об/мин, супернатант перенесли в хроматографическую виалу.

Условия УЭЖХ:

Исследование проводили методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией на хроматографе Waters Acquity с диодно-матричным ультрафиолетовым-детектором (УФ-детектором) и тандемным квадрупольным масс-детектором (МС-детектором) TQD (Waters).

Подвижная фаза А (ПФ А). Смесь вода – ацетонитрил (95 : 5) с муравьиной кислотой.

Подвижная фаза В (ПФ В). Ацетонитрил с муравьиной кислотой.

Хроматографировали испытуемый раствор и растворы стандартов в следующих условиях:

– объем пробы 2 мкл (извлечение, полученное с применением в качестве экстрагента 50%-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 (ГЭР-23)); 5 мкл (извлечение,

полученное с применением в качестве экстрагента 70 %-ого этилового спирта);

- колонка 0,21 x 15,0 см Acuity UPLC ВЕН С18 (1,7 мкм);
- температура колонки 35 °С;
- скорость потока 0,25 мл/мин;
- градиентный режим хроматографирования формируется путем смешивания подвижных фаз А и В по схеме, представленной в таблице 2.

Таблица 2 - Порядок смешивания подвижных фаз в ходе УЭЖХ-МС/МС

Время, мин	ПФ А, %	ПФ В, %
0	95	5
30	50	50
32	0	100
33	95	5
36	95	5

УФ-детекция осуществлялась в диапазоне длин волн 220-500 нм.

Условия масс-спектрометрии:

- сбор данных с 3.0 мин;
- МС детекция в режиме позитивных ионов
параметры детектора: напряжение на капилляре - +3 кВ; напряжение на конусе – 50 В; температура капилляра 450 °С; температура источника 120 °С; скорость потока осушающего газа 800 л/ч, скорость потока газа в конусе 50 л/ч и сканирование в диапазоне масс от 100 до 1500 ед.;
- МС-детекция в режиме негативных ионов
параметры детектора: напряжение на капилляре - -3 кВ; напряжение на конусе – -30 В; температура капилляра 350 °С; температура источника 120 °С; скорость потока осушающего газа 500 л/ч, скорость потока газа в конусе 50 л/ч и сканирование в диапазоне масс от 100 до 1500 ед.

Подбор условий для исключения попадания холина в масс-спектрометр

В процессе изучения структуры извлечения, полученного с применением 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в качестве экстрагента, была обнаружена высокая доля холина хлорида в его составе. Высокая концентрация холина хлорида (около 29 % в извлечении) при попадании в масс-спектрометр может загрязнить источник и квадруполи. Для предотвращения этого необходимо с помощью крана направить поток подвижной фазы на слив до тех пор, пока пик холина полностью не выйдет с колонки.

Для исследования чистого раствора экстрагента (50 %-ый водный раствор ГЭР-23) и исключения попадания холина хлорида в масс-спектрометр были использованы следующие условия:

- объем пробы 2 мкл;
- колонка 0,21 x 5,0 см Acuity UPLC VEN C18 (1,7 мкм);
- температура колонки 35 °С;
- скорость потока 0,5 мл/мин;
- градиентный режим хроматографирования формируется путем смешивания подвижных фаз А и В по схеме, приведенной в таблице 3;

Таблица 3 - Схема режимов хроматографирования чистого экстрагента.

Время, мин	ПФ А, %	ПФ В, %
0	95	5
4	0	100
4.1	95	5
5	95	5

- УФ-детекция: 220-500 нм.

На рисунке 4 приведен анализ образца 50 %-ого раствора ГЭР-23, разбавленного 50 %-ым этиловым спиртом в 100 раз (до концентрации около 0,3% холина хлорида) без поворота крана (сбор данных с начала разделения).

Как можно увидеть, время удерживания пика холина составляет 0.28 мин, однако полностью пик выходит только на 0.5 мин. На рисунке 5 приведен анализ раствора ГЭР, разбавленного этиловым спиртом 1:1 с поворотом крана на 0.5 мин.

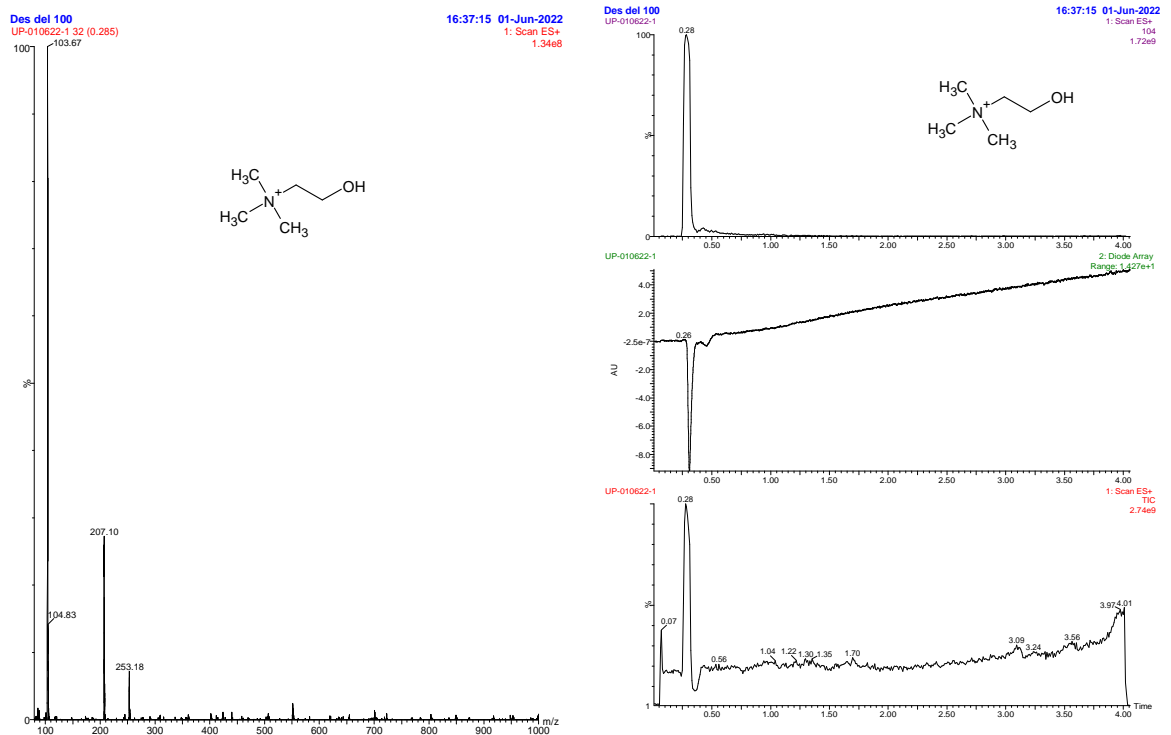


Рисунок 4 - Анализ разбавленного в 100 раз экстрагента.

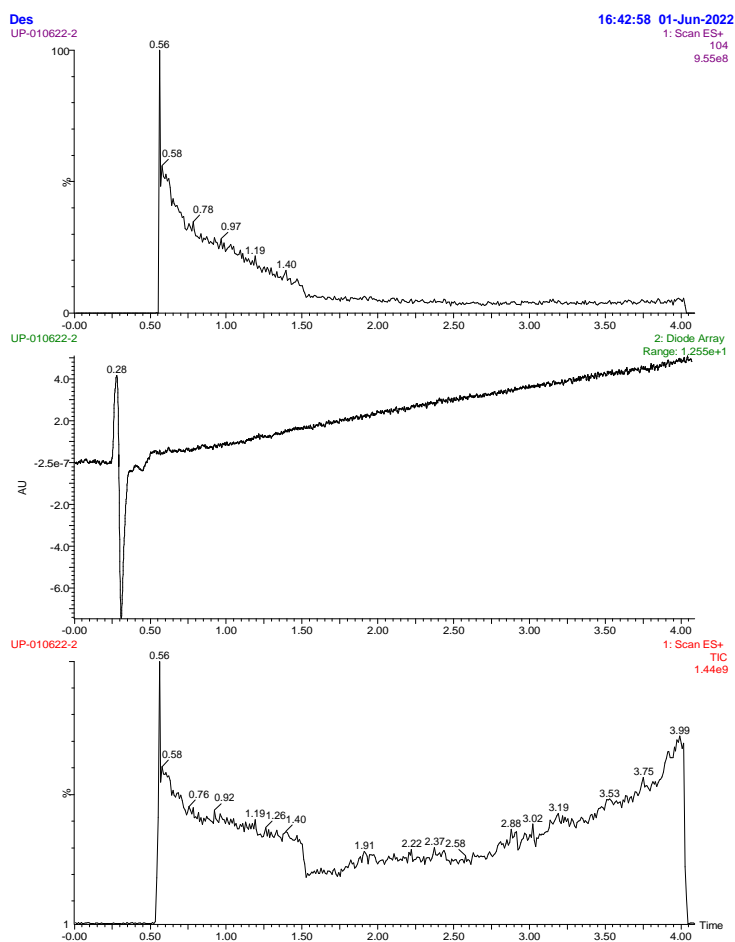


Рисунок 5 - Анализ экстрагента, разбавленного 1:1 с поворотом крана на 0.5 мин.

Видно, что на хроматограмме иона с массой 104 отклик наблюдается до 1.5 мин, но незначительный. Расчет показывает, что при переходе на условия анализа извлечения эквивалентное 0.5 мин время составляет 3.0 мин. На рисунках 6 и 7 показан анализ экстрагента и извлечения, разбавленных этанолом 1:1 с поворотом крана на 3.0 мин в условиях анализа извлечения.

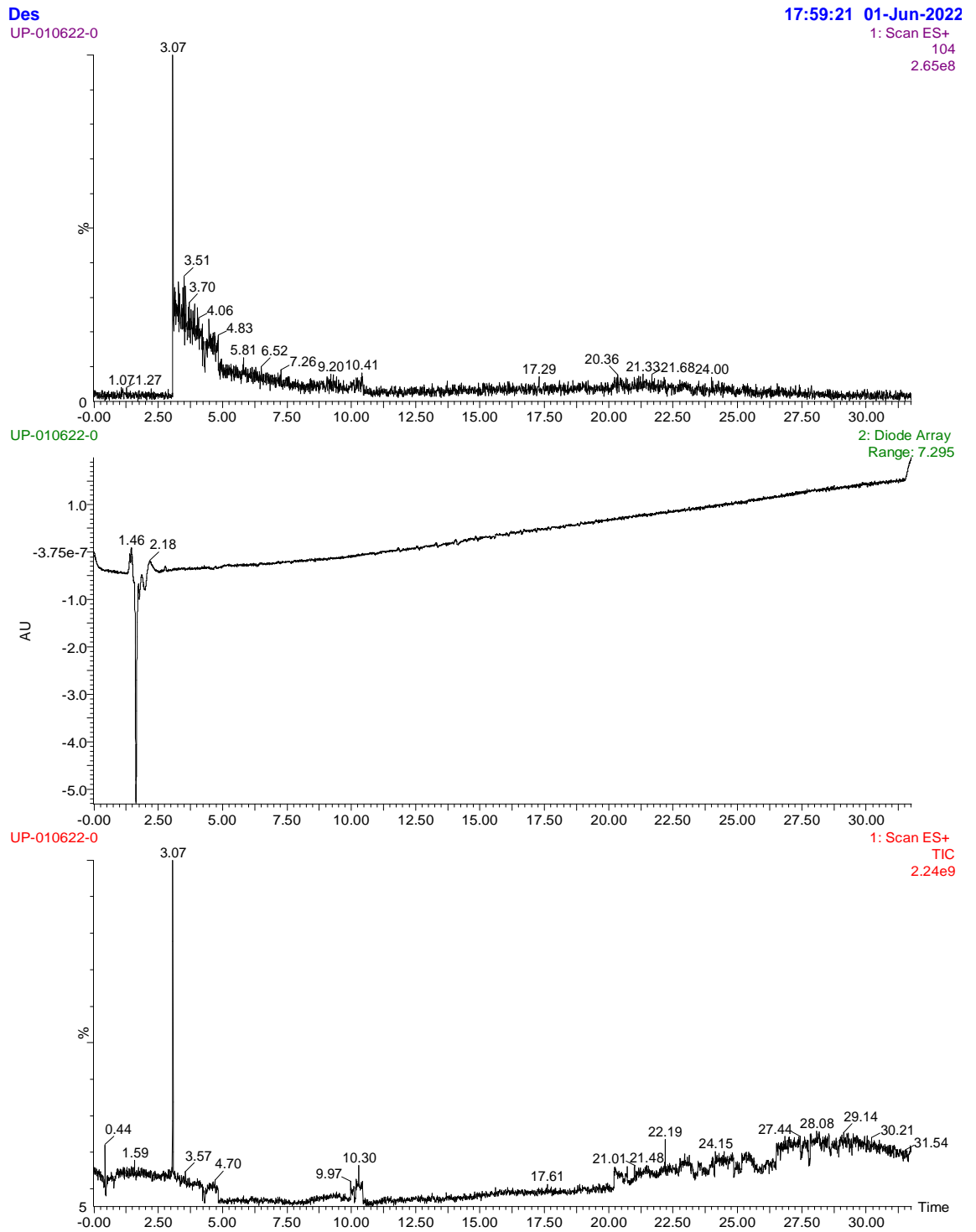


Рисунок 6 - Анализ растворителя, разбавленного 1:1 в условиях анализа извлечения с поворотом крана на 3.0 мин.

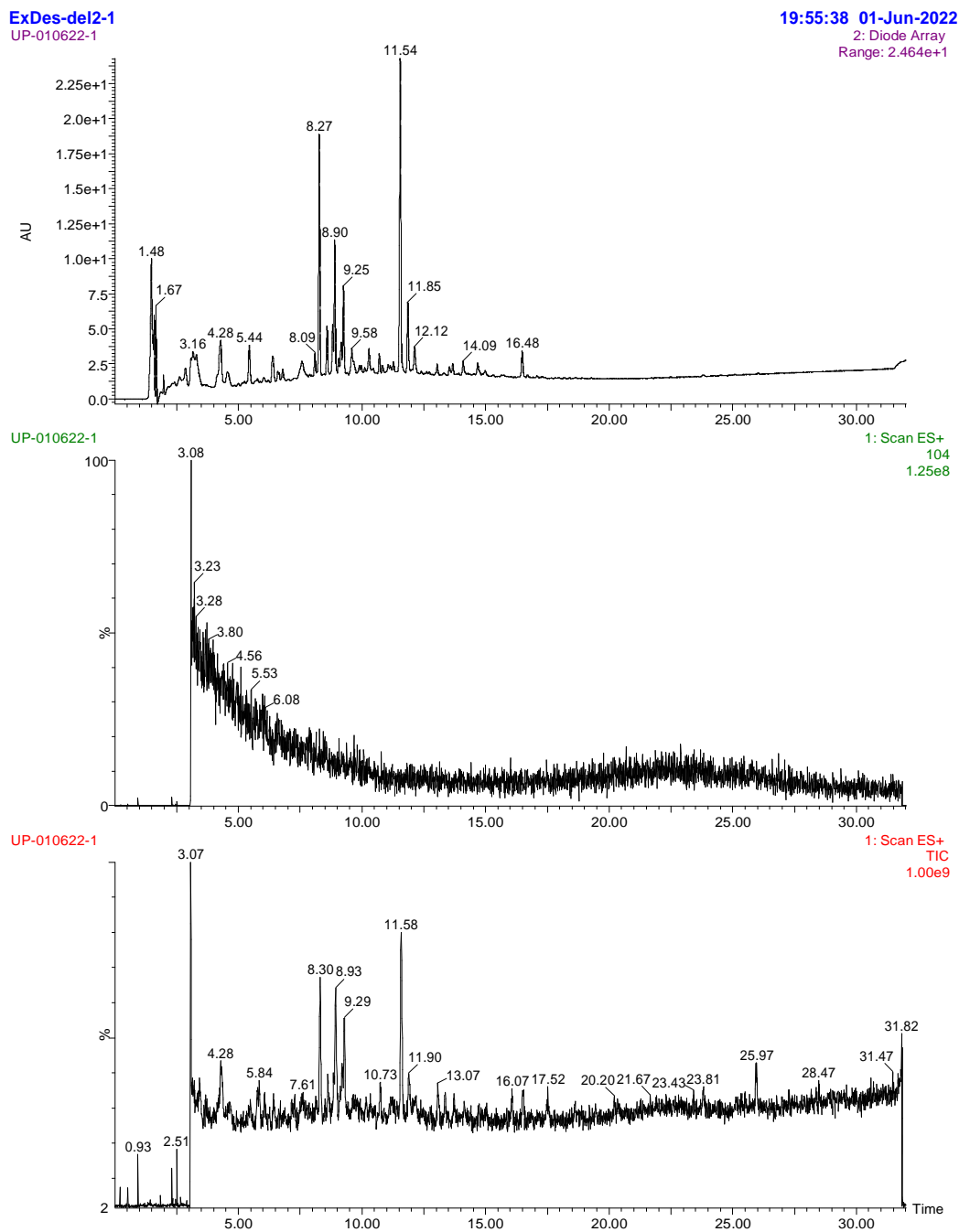


Рисунок 7 - Анализ извлечения, разбавленного 1:1 с поворотом крана на 3.0 мин.

Как видно из проведенного анализа, остаточный отклик холина наблюдается на хроматограмме как в растворителе, так и в извлечении.

2.3.4. Метод поляриметрии

Оптическое вращение — свойство вещества вращать плоскость поляризации при прохождении через него поляризованного света. С учетом того, что угол вращения характерен для каждого индивидуального вещества, метод

поляриметрии является важным неразрушающим методом анализа различных веществ.

При измерении угла вращения руководствовались положениями ГФ XIV издания, ОФС 1.2.1.0018.15 «Поляриметрия». Исследование оптической характеристик извлечения осуществляли с использованием поляриметра POL-1/2 (Atago, Japan) при температуре 25 °С.

2.3.5. Метод ионометрии

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.

2.4. Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли согласно положениям ГФ XIV издания, ОФС 1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента», с использованием программного пакета STATISTICA 10.0.

ГЛАВА 3. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ ФЛАВОНОИДОВ ИЗ МОДЕЛЬНОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЭТИЛОВОГО СПИРТА МЕТОДАМИ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

3.1. Состав модельной растительной композиции

Исследуемая многокомпонентная растительная композиция содержит сумму биологических активных веществ (БАВ) из следующего растительного сырья: травы пустырника сердечного (пустырника обыкновенного) (*Leonurus cardiaca L.*) [7], травы зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum L.*) [6], травы мелиссы лекарственной (*Melissa officinalis L.*) [9] и травы тимьяна ползучего (*Thymus serpyllum L.*) [8].

Состав и содержание каждого компонента растительной композиции были ранее установлены в экспериментальных исследованиях *in vivo* на белых нелинейных мышах в количестве 122 особей в Центре медицины ФГБНУ ВИЛАР. Установленное соотношение компонентов составляет: 4 части травы пустырника обыкновенного, 2,5 части травы зверобоя продырявленного, 2,5 части травы мелиссы лекарственной, 1 часть травы тимьяна ползучего [21].

Обязательным шагом в разработке новой многокомпонентной растительной композиции является установление показателей подлинности: внешних признаков и анатомо-диагностической характеристики [15, 16]. Результаты проведенного макро- и микроскопического анализа растительной композиции [20] приведены в Приложении А.

Следует отметить, что состав композиции сложен и включает различные лекарственные растения, способные оказывать определенное действие на организм человека и имеющие определенные ограничения к применению. БАВ природного происхождения обладают более мягким и генерализованным эффектом, чем их синтетические аналоги, но, тем не менее, имеют ряд противопоказаний, и их использование также должно строго регламентироваться. Так, наиболее частые побочные эффекты препаратов

зверобоя – головная боль, усталость, желудочно-кишечные расстройства и беспокойство [22]; описаны случаи реакций фотосенсибилизации, вызванные содержащимся в траве зверобоя гиперфицином [31]; с осторожностью необходимо применять препараты на основе зверобоя совместно с другими лекарственными средствами из-за частых случаев лекарственного взаимодействия [5]. Многие из лекарственных растительных препаратов противопоказаны беременным и кормящим женщинам и детям (например, препараты валерианы, мелиссы, зверобоя, чабреца, пустырника и др.), что должно учитываться при их назначении и применении.

3.2. Показатели качества растительной композиции

Показатели качества растительной композиции были установлены на пяти партиях в ранее проведенных другими авторами исследованиях [21].

Проведен входной контроль качества растительного сырья. Установлено, что все показатели качества соответствуют нормам, приведенным в частных фармакопейных статьях на данное лекарственное растительное сырье [6 – 9].

Модельная растительная композиция удовлетворяет следующим показателям качества:

- влажность – не более 8,51 %;
- зола общая – не более 7,21 %;
- зола, не растворимая в хлористоводородной кислоте – не более 2,06 %;
- сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее) – не более 2,31 %;
- органическая примесь – не более 0,46 %;
- минеральная примесь – не более 0,38 %;
- сумма флавоноидов в пересчете рутин – не менее 0,89 %;
- содержание экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 % – не менее 24,67 %.

3.3. Математическое моделирование процесса экстрагирования БАВ из модельной растительной композиции с применением этилового спирта

Для получения максимально полного извлечения биологически активных веществ из растительной композиции необходимо подобрать оптимальные условия с модификацией наибольшего количества факторов, влияющих на процесс экстракции [13]. Согласно ГФ РФ регламентированным экстрагентом БАВ для каждого из компонентов растительной композиции является этиловый спирт различной концентрации в зависимости от определенного вида лекарственного растительного сырья. Данные литературы свидетельствуют о том, что оптимальным экстрагентом для каждого вида лекарственного растительного сырья является: спирт этиловый 70 % для травы пустырника, травы чабреца и травы мелиссы лекарственной, 50 % этиловый спирт для травы зверобоя. Другими факторами, влияющими на эффективность процесса экстракции, которые необходимо учитывать при оптимизации процесса, являются температура экстрагирования, степень измельчения растительного сырья и соотношение сырье-экстрагент.

Как было описано выше, основными факторами, влияющими на выход действующих веществ, являются концентрация экстрагента, соотношение «сырье : экстрагент», температура экстракции.

Взаимное влияние факторов на выход флавоноидов было решено оценить с помощью методов математического моделирования.

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 [3].

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) на основании экспериментов, проведенных в работе [21], 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 4.

Таблица 4 - 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 5).

Таблица 5 – 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 6).

Таблица 6 - Схема композиционного плана эксперимента

Характеристики \ Переменные	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

Предположим, что поверхность отклика можно описать многочленом второй степени вида

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{j>i \geq 1}^k b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2, \quad i = 1, 2, \dots, k$$

Перенумеровав коэффициенты, получим уравнение линейного вида

$$\hat{y} = b'_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_4 x_4 + b_5 x_5 + b_6 x_6 + b_7 x_7 + b_8 x_8 + b_9 x_9 + b_{10} x_{10} \quad (1),$$

где $b_4 = b_{12}$, $b_5 = b_{13}$, $b_6 = b_{23}$, $b_7 = b_{123}$, $b_8 = b_{11}$, $b_9 = b_{22}$, $b_{10} = b_{33}$

и $b_0 = b'_0 - (b_{11} \overline{x_1^2} + b_{22} \overline{x_2^2} + b_{33} \overline{x_3^2})$.

При этом $b_t = (\sum_{u=1}^N y_u x_{tu}) : (\sum_{u=1}^N x_{tu}^2) \quad (2)$,

где $b_t = b'_0, b_i, b_{ij}, b_{ii}$

Преобразуем квадраты факторов согласно формуле

$$x_i^2 = x'_i + \frac{1}{N} \sum_{u=1}^N x_{iu}^2 = x'_i + \overline{x_{iu}^2}, \quad i = 1, 2, \dots, k:$$

$$x_1^2 = x_8 + \frac{1}{15} \sum_{u=1}^{15} x_{1u}^2 = x_8 + \overline{x_{1u}^2}, \quad x_8 = x_1^2 - \frac{10}{15} = x_1^2 - \frac{2}{3};$$

$$x_2^2 = x_9 + \frac{1}{15} \sum_{u=1}^{15} x_{2u}^2 = x_9 + \overline{x_{1u}^2}, \quad x_9 = x_2^2 - \frac{10}{15} = x_2^2 - \frac{2}{3};$$

$$x_3^2 = x_{10} + \frac{1}{15} \sum_{u=1}^{15} x_{3u}^2 = x_{10} + \overline{x_{1u}^2}, \quad x_{10} = x_3^2 - \frac{10}{15} = x_3^2 - \frac{2}{3},$$

По формуле 2

$$b'_0 = 18,80 : 15 = 1,253$$

$$b_1 = -0,12 : 10 = -0,012$$

$$b_2 = -0,81 : 10 = -0,081$$

$$b_3 = 0,28 : 10 = 0,028$$

$$b_{12} = -0,03 : 8 = -0,00375$$

$$b_{13} = -0,05 : 8 = 0,0625$$

$$b_{23} = -0,11 : 8 = 0,01375$$

$$b_{123} = -0,07 : 8 = 0,00875$$

$$b_{11} = -0,333 : 3,333 = -0,1$$

$$b_{22} = -0,303 : 3,333 = -0,091$$

$$b_{33} = -0,333 : 3,333 = -0,1$$

$$b_0 = 1,235 - \left(\frac{2}{3}\right) \cdot (-0,1) + \frac{2}{3} \cdot (-0,091) + \frac{2}{3} \cdot (-0,1) = 1,429$$

Тогда

$$\hat{y} = 1,429 - 0,012x_1 - 0,081x_2 + 0,028x_3 - 0,00375x_1x_2 + 0,0625x_1x_3 + \\ + 0,01375x_2x_3 + 0,00875x_1x_2x_3 - 0,1x_1^2 - 0,091x_2^2 - 0,1x_3^2$$

По результатам 6 параллельных опытов на основном уровне определили дисперсию $s^2 = 0,00038$ и стандартное отклонение $s = 0,0194$.

Тогда оценка дисперсии, характеризующая ошибку коэффициента, равна

$$s^2(b_i) = s^2 : (\sum_{u=1}^N x_{iu}^2),$$

$$s^2(b_0) = s^2(b'_0) + s^2(b_1)\overline{x_1^2} + \dots + s^2(b_{kk})\overline{x_k^2}$$

$$s^2(b'_0) = 0,00038 : 15 = 0,0000253$$

$$s^2(b_1) = s^2(b_2) = s^2(b_3) = 0,00038 : 10 = 0,000038$$

$$s^2(b_{12}) = s^2(b_{13}) = s^2(b_{23}) = s^2(b_{123}) = 0,00038 : 8 = 0,0000475$$

$$s^2(b_{11}) = s^2(b_{22}) = s^2(b_{33}) = 0,00038 : 3,33 = 0,0001141$$

$$s^2(b_0) = 0,0000253 + \frac{2}{3} \cdot 0,0001141 + \frac{2}{3} \cdot 0,0001141 + \frac{2}{3} \cdot 0,0001141 = 0,002307$$

Оценим значимость коэффициентов полученного уравнения:

По формуле

$$t_i = |b_i| : s(b_i)$$

получим:

$$t_0 = 30,12$$

$$t_1 = 1,95$$

$$t_2 = 13,14$$

$$t_3 = 4,54$$

$$t_{12} = 0,54$$

$$t_{13} = 0,91$$

$$t_{23} = 1,995$$

$$t_{123} = 1,27$$

$$t_{11} = 9,36$$

$$t_{22} = 8,52$$

$$t_{33} = 9,36$$

При сравнении с табличным значением $t_{0,95(5)} = 2,01$ было установлено, что значимыми являются коэффициенты $t_0, t_2, t_3, t_{11}, t_{22}, t_{33}$ (критерий значимости: $t_i > t_{0,95}$).

Заменяя незначимые коэффициенты уравнения на 0, получили окончательное уравнение, характеризующее процесс экстракции:

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

Найдем экстремумы полученной функции. Для этого приравняем производные по каждой из переменных к 0:

$$\begin{cases} \frac{\partial y}{\partial x_1} = -0,2x_1 = 0, \\ \frac{\partial y}{\partial x_2} = -0,081 - 0,182x_2 = 0, \\ \frac{\partial y}{\partial x_3} = 0,028 - 0,2x_3 = 0 \end{cases}$$

$$\begin{cases} x_1 = 0, \\ x_2 = -0,445, \\ x_3 = 0,14 \end{cases}$$

Тогда максимум функции в точке экстремумов равен:

$$\hat{y} = 1,45$$

Факторы X_i связаны с переменными x_i по формуле:

$$X_i = a_i + x_i c_i$$

Отсюда

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

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

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

Так как вычисленное максимальное значение выхода флавоноидов наблюдается при параметрах, наиболее близких к основному уровню значений рассматриваемых факторов в пределах выбранного шага, было решено оставить их в качестве оптимальных.

Таким образом, были подобраны оптимальные условия традиционного экстрагирования флавоноидов из модельной растительной композиции: сырье, измельченное до 2-3 мм, экстрагируют этиловым спиртом 70 %-ой концентрации при температуре 60 °С в течение 1 часа при соотношении сырья и экстрагента 1:12.

Проведенная в соответствии с вышеперечисленными условиями экстракция позволила извлечь $1,33 \pm 0,02$ %, или $13,30 \pm 0,20$ мг/г (относительно массы сухого сырья) флавоноидов в пересчете на рутин из модельной растительной композиции.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

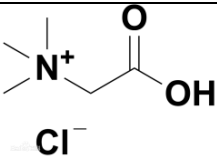
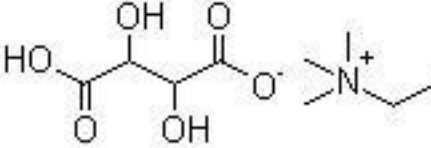
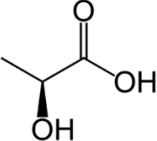
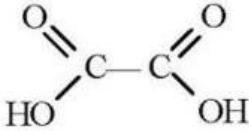
1. Проведен входной контроль качества растительного сырья. Установлено, что все показатели качества соответствуют нормам, приведенным в частных фармакопейных статьях на данное лекарственное растительное сырье.
2. Проведен макро- и микроскопический анализ растительной композиции, подтверждающий морфолого-анатомические диагностические признаки ее компонентов.
3. Методом математического моделирования эксперимента проведена оптимизация метода экстракции БАВ из модельной растительной композиции с применением 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.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ГЛУБОКИХ ЭВТЕКТИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

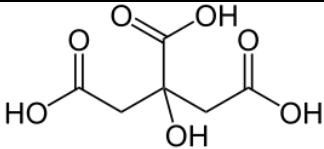
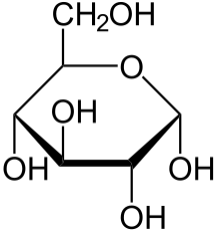
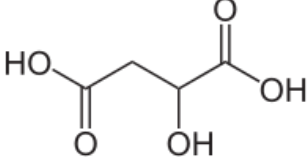
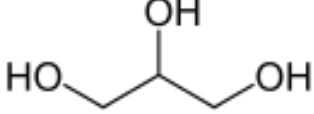
4.1. Характеристика производящих веществ

Глубокие эвтектические растворители готовили из веществ, способных по своим физико-химическим свойствам к образованию эвтектических смесей. Однако следует учитывать, что, несмотря на способность этих веществ образовывать эвтектические смеси, не все они являются безопасными для человека. Характеристика компонентов эвтектических растворителей приведена в таблице 7.

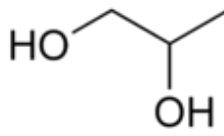
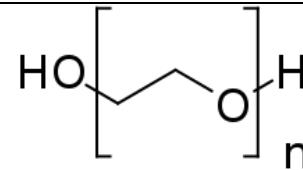
Таблица 7 - Характеристика компонентов ГЭР

Вещество	Характеристика	Структурная формула
Бетаина гидрохлорид	Кристаллический порошок белого цвета, растворимость в воде - 64,7 г/100 мл (25 °С), М (молекулярная масса) = 153,6. Т _{пл} = 241-242 °С.	
Холина битартрат	Порошок белого цвета без запаха или со слабым запахом. Легко растворим в воде; слабо растворяется в спирте; нерастворим в эфире, хлороформе и бензоле. М (молекулярная масса) = 253,25. Т _{пл} = 151-153 °С.	
Молочная кислота	Почти прозрачная, слегка желтоватая гигроскопичная сиропообразная жидкость со слабым кислым запахом. Плотность - 1,18-1,20 г/мл. Растворима в воде, этаноле, плохо - в бензоле, хлороформе и других галогенуглеводородах. М (молекулярная масса) = 90,08. Т _{пл} = 16,8 °С.	
Щавелевая кислота	Вещество в виде бесцветных кристаллов, растворимых в воде, неполностью – в диэтиловом и этиловом спирте, нерастворимых в бензоле, хлороформе, петролейном эфире. М (молекулярная масса)	

Продолжение таблицы 7

Вещество	Характеристика	Структурная формула
	<p>= 90,04. Растворимость в воде составляет 10 г/100 мл (20 °С). $T_{пл} = 189,5$ °С. Данный химический реактив относится к сильным органическим кислотам. Щавелевая кислота, несмотря на то что в малых количествах содержится в некоторых растениях, относится к горючим, высокотоксичным и ядовитым химическим реактивам. Смертельная доза щавелевой кислоты для человека при приеме внутрь определена как 140-150 мг/кг массы.</p>	
Лимонная кислота	<p>Лимонная кислота представляет собой кристаллическое вещество белого цвета, без запаха. Лимонная кислота является трёхосновной кислотой средней силы. Хорошо растворима в воде, растворима в этиловом спирте, малорастворима в диэтиловом эфире. М (молекулярная масса) = 192,13. $T_{пл} = 153$ °С.</p>	
Глюкоза	<p>Бесцветное кристаллическое вещество без запаха. Обладает сладким вкусом. М (молекулярная масса) = 180,16. Растворимость в воде составляет 82 г/100 мл (25 °С), этаноле (80%) - 2 г/100 мл.</p>	
Яблочная кислота	<p>Бесцветные гигроскопичные кристаллы, хорошо растворимые в воде, этиловом спирте и диэтиловом эфире. М (молекулярная масса) = 134,1. $T_{пл} = 100$ °С.</p>	
Глицерин	<p>Бесцветная вязкая жидкость без запаха. Гигроскопичен, поглощает воду из атмосферы в количестве до 40 % от собственной массы. С водой, метанолом, этанолом смешивается в любых пропорциях, не растворим в эфире и хлороформе.</p>	

Продолжение таблицы 7

Вещество	Характеристика	Структурная формула
	Плотность - 1,26 г/мл. М (молекулярная масса) = 92,09. T _{пл} = 17,9 °С.	
1,2 - пропиленгликоль	Прозрачная вязкая жидкость. Полностью смешивается с большинством низкомолекулярных органических соединений, содержащих кислород и азот. Плотность - 1,04 г/мл. М (молекулярная масса) = 76,09. T _{пл} = -60 °С. Используется только в составе средств для наружного применения, не для приема внутрь.	
ПЭГ-400	ПЭГ-400 (полиэтиленгликоль-400) представляет собой низкомолекулярный сорт полиэтиленгликоля. Это прозрачная, бесцветная, вязкая жидкость. ПЭГ-400 растворим в воде, ацетоне, спиртах, бензоле, глицерине, гликолях и ароматических углеводородах и слабо растворим в алифатических углеводородах. Плотность - 1,128 г/мл. М (молекулярная масса) = 380-420. T _{пл} = 4-8 °С. Используется только в составе средств для наружного применения, не для приема внутрь.	

Как видно из приведенной таблицы, данные вещества обладают высоким потенциалом для образования водородных связей и межмолекулярных взаимодействий. Первоначальный выбор компонентов ГЭР был основан именно на их химической структуре и низкой летучести без проведения анализа токсикологических и фармакологических эффектов, только с целью скрининга экстрагирующей способности ГЭР как нового класса веществ для дальнейшего поиска путей их оптимизации и усовершенствования их качественного и количественного составов.

4.2. Получение глубоких эвтектических растворителей

Методика изготовления ГЭР

Для получения различных комбинаций ГЭР был использован тепловой метод. Компоненты смешивали в определенных мольных соотношениях в стеклянной конической колбе, закрывали пробкой и нагревали при 60 °С на водяной бане до образования однородной прозрачной жидкости (60-90 мин), устойчивой и стабильной при комнатной температуре.

В данном эксперименте нами получен 21 глубокий эвтектический растворитель. Их описание и состав приведены в таблице 8. Изготовленные ГЭР представляют собой вязкие прозрачные жидкости.

Таблица 8 – Первые составы экспериментальных ГЭР

Название	Компонент			Мольное соотношение
	1	2	3	
ГЭР 1	Бетаина гидрохлорид	Молочная кислота	Вода	1:1:2
ГЭР 2	Бетаина гидрохлорид	Щавелевая кислота	Вода	1:1:1
ГЭР 3	Бетаина гидрохлорид	Щавелевая кислота	Вода	1:1:2
ГЭР 4	Холина битартрат	Лимонная кислота	Вода	1:1:2
ГЭР 5	Холина битартрат	Лимонная кислота	Вода	1:1:1
ГЭР 6	Холина битартрат	Молочная кислота	Вода	1:1:2
ГЭР 7	Холина битартрат	Глюкоза	Вода	5:2:5
ГЭР 8	Холина битартрат	Молочная кислота	ПЭГ-400	1:1:0,5
ГЭР 9	Холина битартрат	Лимонная кислота	ПЭГ-400	1:1:0,5
ГЭР 10	Бетаина гидрохлорид	Яблочная кислота	Вода	1:1:1
ГЭР 11	Бетаина гидрохлорид	Яблочная кислота	Вода	2:1:1
ГЭР 12	Бетаина гидрохлорид	Яблочная кислота	Вода	1:1:2
ГЭР 13	Бетаина гидрохлорид	Молочная кислота	-	1:1
ГЭР 14	Холина битартрат	Яблочная кислота	Вода	1:1:1
ГЭР 15	Холина битартрат	Молочная кислота	-	1:1
ГЭР 16	Бетаина гидрохлорид	Глюкоза	Вода	5:2:5
ГЭР 17	Холина битартрат	Яблочная кислота	Пропиленгликоль	1:1:3
ГЭР 18	Бетаина гидрохлорид	Яблочная кислота	Глицерин	1:1:3
ГЭР 19	Бетаина гидрохлорид	Яблочная кислота	Пропиленгликоль	1:1:3
ГЭР 20	Бетаина гидрохлорид	Пропиленгликоль	-	1:3
ГЭР 21	Бетаина гидрохлорид	Глицерин	-	1:3

4.3. Экстракция флавоноидов из модельной растительной композиции

В качестве объекта исследования использована растительная композиция, подробное описание которой приведено в главе 3. Для первоначального скрининга экспериментальных образцов ГЭР, представленных в таблице 8, изготовлены их 50 %-ые водные растворы (в массовом соотношении).

Методика экстракции:

Около 2 г (точная навеска) исследуемого сырья 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 °С 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.

Все извлечения были получены в одинаковых условиях: отношение сырье : экстрагент = 1:15 г/мл (соотношение экстрагента к сырью 1:10 – 1:12 продемонстрировало недостаточную смачиваемость сырья), время экстракции 1 ч, температура экстракции 60 °С. Усовершенствование процесса экстрагирования осуществлялось после выбора одного экспериментального состава ГЭР по параметрам содержания воды в растворе ГЭР (30, 40, 50, 60 и 70 %) и температуры экстракции (50, 60, 70, 80 °С).

Количественное определение БАВ – суммы флавоноидов в пересчете на рутин – осуществлялось методом дифференциальной спектрофотометрии.

Все эксперименты проводились в трех повторностях.

4.4. Результаты и обсуждение процесса экстракции флавоноидов с использованием первых экспериментальных составов ГЭР

4.4.1. Влияние состава ГЭР на процесс экстракции флавоноидов

Эффективность ГЭР для извлечения флавоноидов была доказана ранее проводимыми исследованиями [29, 35, 50, 68, 75]. Нами изготовлен и

протестирован 21 глубокий эвтектический растворитель на предмет эффективности экстракции флавоноидов из растительной композиции на основе травы пустырника, травы зверобоя, травы Melissa и травы чабреца. Эффективность процесса извлечения БАВ изучена в сравнении со спиртом этиловым 70 %-ой и 96 %-ой концентраций и водой в качестве экстрагентов. Вязкость изготовленных ГЭР снижена их разбавлением 50 % воды (по массе, м/м). В качестве акцептора протона выступали холина битартрат или бетаина гидрохлорид, в качестве донора – органические кислоты, спирты и сахара.

Данные по экстракции флавоноидов из растительной композиции с применением 50 %-ых водных растворов экспериментальных составов ГЭР приведены на рисунке 8 и отображены в таблице 9.

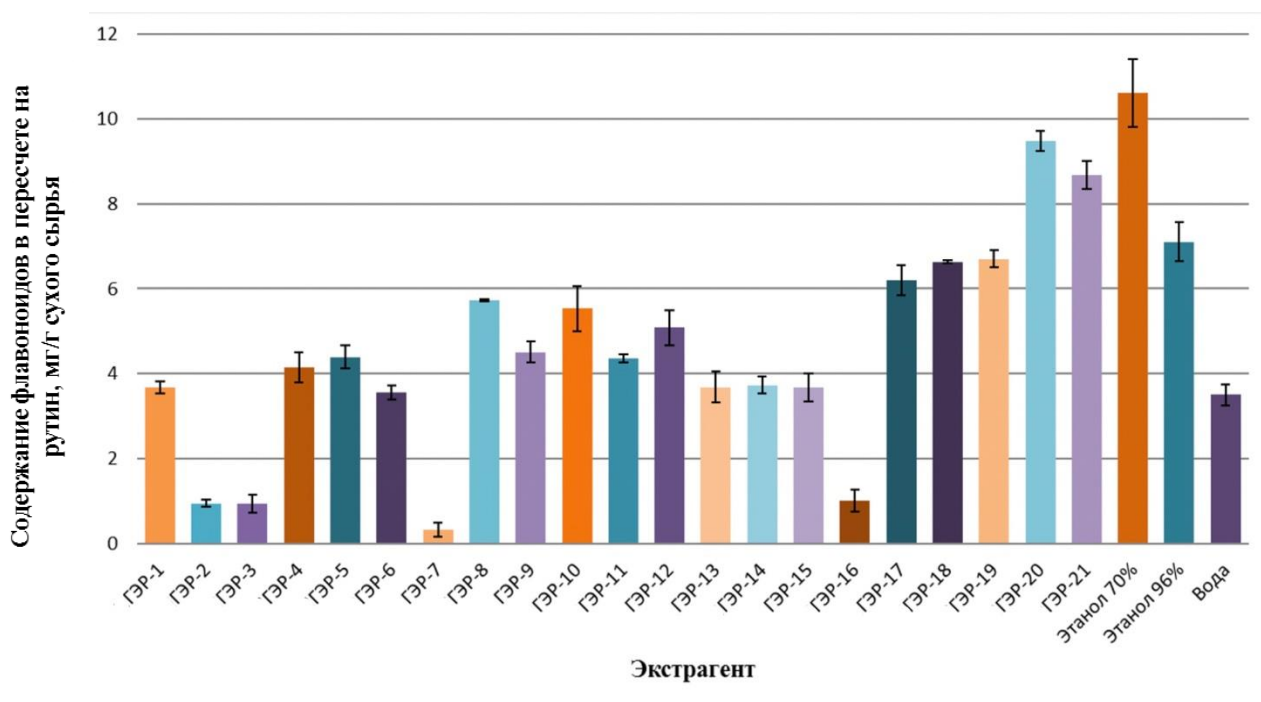


Рисунок 8 - Содержание флавоноидов (мг/г), извлекаемое с применением различных экстрагентов*

*В качестве экстрагента применялись 50 %-ые водные растворы соответствующих ГЭР

Таблица 9 - Влияние состава экстрагента на извлечение флавоноидов

Экстрагент*	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин (мг/г)	Экстрагент*	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин (мг/г)
ГЭР-1	3,67 ± 0,15	ГЭР-13	3,68 ± 0,37
ГЭР-2	0,94 ± 0,08	ГЭР-14	3,73 ± 0,21
ГЭР-3	0,94 ± 0,21	ГЭР-15	3,68 ± 0,33
ГЭР-4	4,15 ± 0,35	ГЭР-16	1,01 ± 0,26
ГЭР-5	4,39 ± 0,27	ГЭР-17	6,19 ± 0,35
ГЭР-6	3,56 ± 0,16	ГЭР-18	6,63 ± 0,03
ГЭР-7	0,33 ± 0,17	ГЭР-19	6,70 ± 0,20
ГЭР-8	5,73 ± 0,03	ГЭР-20	9,48 ± 0,23
ГЭР-9	4,51 ± 0,25	ГЭР-21	8,67 ± 0,33
ГЭР-10	5,53 ± 0,53	Этанол 70 %	10,60 ± 0,80
ГЭР-11	4,35 ± 0,09	Этанол 96 %	7,10 ± 0,46
ГЭР-12	5,08 ± 0,42	Вода	3,50 ± 0,24

*В качестве экстрагента применялись 50 %-ые водные растворы соответствующих ГЭР

Как видно из приведенных данных, способность ГЭР к извлечению флавоноидов зависит от состава конкретного экстрагента. Для ГЭР, основу которых составлял холина битартрат как акцептор протона, извлекающая способность оказалась в целом ниже, чем для ГЭР на основе бетаина гидрохлорида. Возможно, это обусловлено особенностью возникновения водородных связей между компонентами ГЭР. Хлорид-анион – более сильный акцептор протонов, чем ион битартрата, Доказано, что флавоноиды конкурируют с донорами протонов в составе ГЭР за образование водородных связей [64]. Чем больше образуется водородных связей в структуре ГЭР, тем большее количество флавоноидов может взаимодействовать с компонентами растворителя и извлекаться из растительного материала. Кроме того, больший размер аниона битартрата по сравнению с хлорид-ионом может способствовать возникновению стерических препятствий к образованию водородных связей.

Важное значение играет и тип донора протонов. Целевые экстрагируемые соединения – флавоноиды, обладающие слабыми кислотными свойствами за счет свободных фенольных гидроксильных групп и поэтому хорошо растворимые в растворах щелочей. ГЭР, базирующиеся на органических кислотах как донорах протона, имеют более кислую среду [84] и поэтому хуже извлекают флавоноиды, чем ГЭР, включающие спирты в качестве доноров

протонов. Кроме того, по-видимому, образуемые органическими кислотами водородные связи более устойчивы, и экстрагируемым флавоноидам труднее заместить их в составе растворителя, т.е. энтальпия сольватации полиолов и сахаров в составе ГЭР более экзотермична и выгодна для извлечения целевых соединений их растительного материала [25].

Таким образом, на основании экстрагирующей способности из приготовленных экспериментальных ГЭР был выбран ГЭР-20 на основе бетаина гидрохлорида и пропиленгликоля в мольном соотношении 1:3. С помощью 50%-ого водного раствора данного ГЭР удалось извлечь $9,48 \pm 0,23$ мг/г (относительно массы сухого сырья) флавоноидов в пересчете на рутин из модельной растительной композиции, что составляет 89,4 % от содержания флавоноидов, извлекаемых с применением 70 %-ого этилового спирта в качестве экстрагента при таких же условиях и параметрах и взятого в качестве стандарта [66].

4.4.2. Влияние содержания воды в составе ГЭР на процесс экстракции флавоноидов

Далее нами изучен эффект содержания воды в составе ГЭР на его экстрагирующую способность. Получены ГЭР на основе бетаина гидрохлорида – пропиленгликоля в мольном соотношении 1:3 (ГЭР-20), которые разбавляли водой (содержание воды в составе экстрагента составило 30, 40, 50, 60 и 70 % по массе), которые использовали в качестве экстрагентов флавоноидов из растительной композиции. Экстракция осуществлялась при температуре 60 °С в течение 1 ч при соотношении сырье : экстрагент 1:15 г/мл.

Зависимость экстрагирующей способности ГЭР от его концентрации графически представлена на рисунке 9.

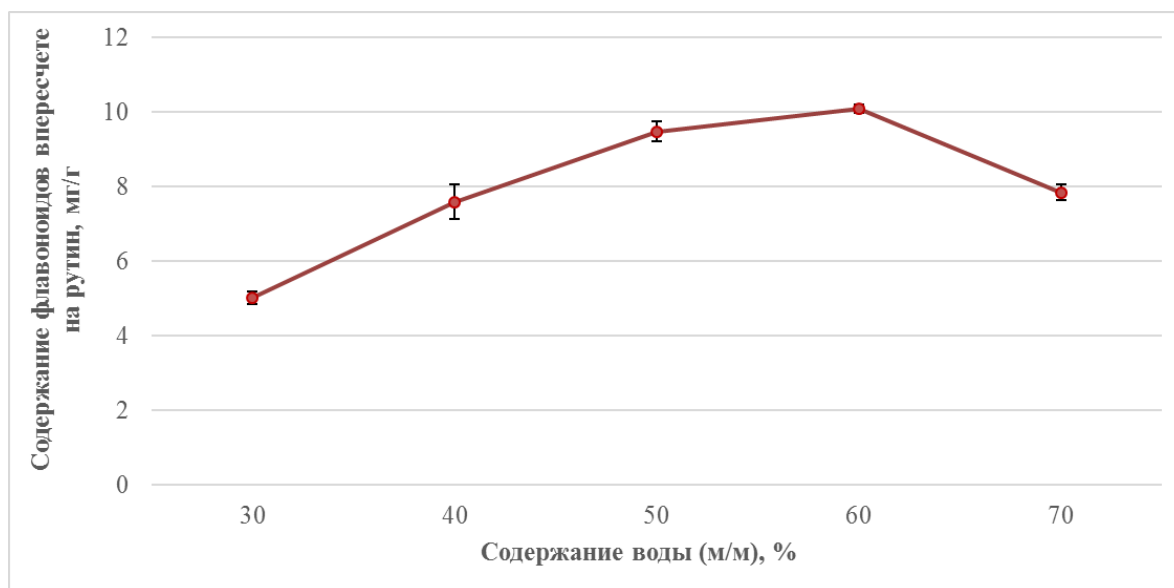


Рисунок 9 - Содержание флавоноидов (мг/г сухого сырья), извлекаемое с помощью водных растворов ГЭР-20 с различным содержанием воды.

Как видно из рисунка, с разбавлением ГЭР извлекающая способность экстрагента сначала увеличивается, что может быть вызвано повышением его полярности, а также уменьшением вязкости. Это облегчает процесс диффузии согласно уравнению Стокса-Эйнштейна [79]:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R},$$

где D – коэффициент диффузии,

k – постоянная Больцмана,

T – абсолютная температура,

η – вязкость среды,

R – гидродинамический радиус молекулы.

Однако после определенного значения дальнейшее увеличение содержания воды приводит к уменьшению выхода флавоноидов из растительного сырья, что можно объяснить разрывом существующих водородных связей и нарушением надмолекулярной структуры ГЭР.

Таким образом, было установлено, что оптимальное содержание воды в ГЭР на основе бетаина гидрохлорида и пропиленгликоля (мольное соотношение 1:3) составляет 60 % (40 %-ый водный раствор ГЭР-20).

4.4.3. Влияние температуры на процесс экстракции флавоноидов

Чтобы определить оптимальную температуру экстракции, была осуществлена экстракция флавоноидов из растительной композиции при температурах 50, 60, 70 и 80 °С. Эффект, оказываемый температурой на извлечение БАВ, представлен на рисунке 10.

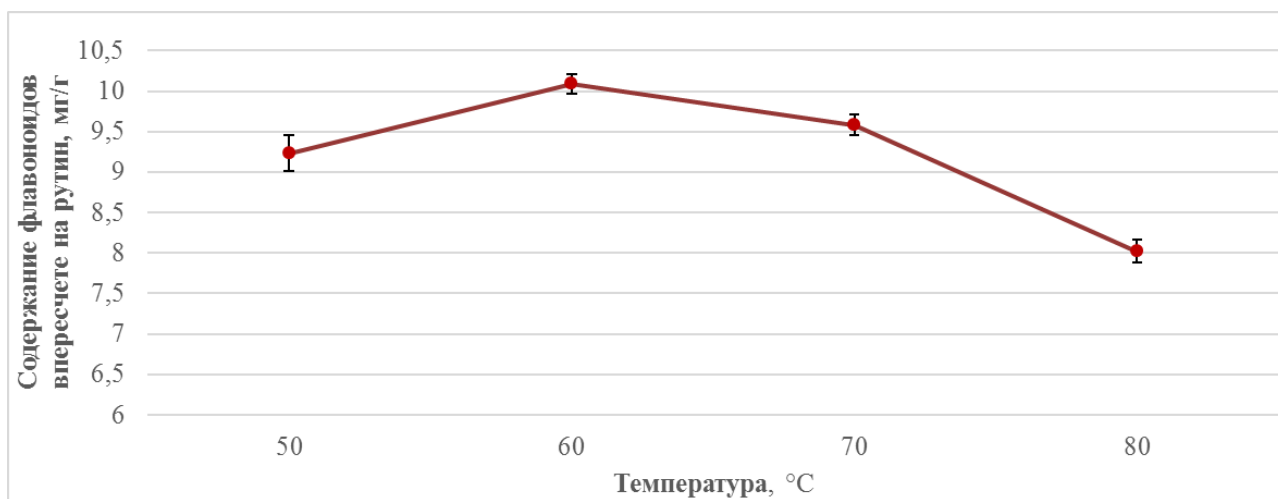


Рисунок 10 - Содержание флавоноидов (мг/г сухого сырья), извлекаемое с помощью 40 %-ого водного раствора ГЭР-20 при различных температурах.

Повышение температуры экстракции, с одной стороны, ведет к увеличению скорости диффузии, но, с другой стороны, приводит к разрушению флавоноидов как термолабильных соединений.

Экстракцию флавоноидов из растительной композиции проводили с помощью 40 %-ого водного раствора ГЭР-20 на основе бетаина гидрохлорида – пропиленгликоля (мольное соотношение 1:3) при температурах 50, 60, 70 и 80 °С в течение 1 ч. На основании полученных экспериментальных данных было установлено, что оптимальная температура, позволяющая извлечь из сырья и сохранить наибольшее количество флавоноидов, составляет 60 °С [10].

4.5. Методы очистки и удаления экстрагента

Стоит особенно отметить тот факт, что обязательным шагом при использовании ГЭР является удаление экстрагента из-за отсутствия данных о токсикологическом профиле эвтектических растворителей и применения небезопасных для человека веществ при их получении. ГЭР на основе полиолов и спиртов (таких, как используемые нами ПЭГ-400, глицерин, пропиленгликоль) имеют весьма строгие ограничения для дальнейшего применения: так, из-за токсичности и небезопасности для организма их нельзя использовать для приема внутрь. ГЭР на основе щавелевой кислоты трудны в получении, неустойчивы (кристаллы щавелевой кислоты выпадают в осадок), но, что является наиболее значимым фактором, щавелевая кислота крайне токсична, даже малые ее дозы оказывают повреждающее действие на организм человека, и ее применения следует избегать. Таким образом, удаление экстрагента – необходимый шаг при использовании ГЭР.

Следовательно, дальнейшим этапом нашей работы был поиск способа очистки полученных извлечений от экстрагента (а именно, выбранного нами как наиболее эффективного ГЭР на основе бетаина гидрохлорида и пропиленгликоля) для возможности выделения БАВ в чистом виде.

Для возможности выпаривания ГЭР из полученного извлечения мы использовали вакуумную сушку. Однако в ходе эксперимента было показано, что в условиях вакуума полученное извлечение (с использованием ГЭР-20 в качестве экстрагента) не поддается сушке: спустя 24 ч извлечение остается в жидкой форме, что говорит о неэффективности проводимого процесса. Дальнейшее продолжение выпаривания признано нерациональным с экономической точки зрения.

Другим способом очистки извлечений является жидко-жидкостная экстракция с использованием органических жидкостей. Нами были проведены эксперименты, в которых полученное извлечение очищали 1) хлороформом; 2)

диэтиловым эфиром. После удаления хлороформа и эфира содержание компонентов в извлечении проверяли методом ИК-спектрометрии.

Изначально измеряли ИК-спектры компонентов ГЭР в чистом виде для возможности их дальнейшей идентификации в составе извлечения. ИК-спектры индивидуальных веществ представлены на рисунках 11 и 12.

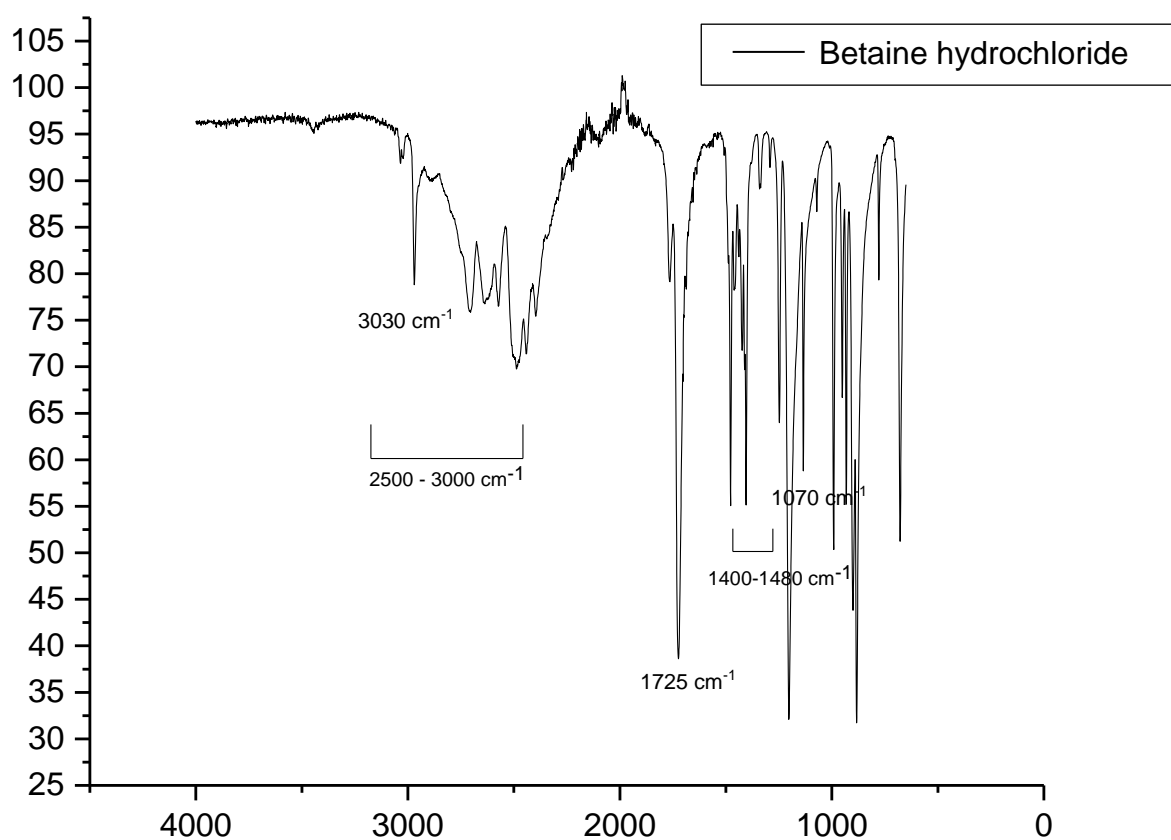


Рисунок 11 - ИК-спектр бетаина гидрохлорида

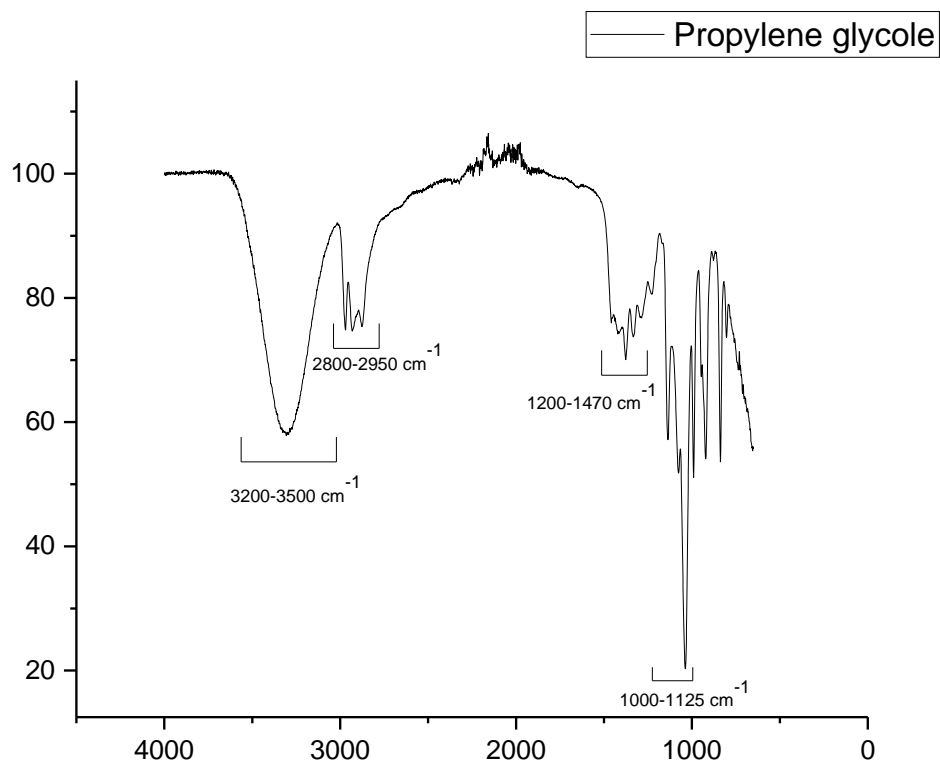


Рисунок 12 - ИК-спектр пропиленгликоля

На ИК-спектре бетаина гидрохлорида видны характерные полосы в области $2500-3000\text{ см}^{-1}$, соответствующие валентным колебаниям O-H карбоксильной группы, которые перекрываются с валентными колебаниями C-H в составе метильных групп $-\text{CH}_3$. Полоса, наблюдающаяся при частоте 3030 см^{-1} , характерна для карбоксильной группы $-\text{COOH}$, а пик поглощения в области 1725 см^{-1} говорит о присутствии в составе соединения карбонильного фрагмента $-\text{C}=\text{O}$. Присутствие нескольких пиков при частотах $1400-1480\text{ см}^{-1}$ характерно для метиленового фрагмента $-\text{CH}_2-$, имеющегося в молекуле бетаина гидрохлорида. Важной для идентификации соединения полосой является наличие максимума поглощения при частоте 1070 см^{-1} , характеризующего валентные колебания C-N связи.

На ИК-спектре пропиленгликоля видна широкая полоса в области $3200-3500\text{ см}^{-1}$, соответствующие валентным колебаниям O-H в составе гидроксильных групп, а также максимумы поглощения в областях $2800 - 2950\text{ см}^{-1}$ и $1200-1470\text{ см}^{-1}$, связанные с колебаниями C-H в составе метильной группы

$-\text{CH}_3$. Характерной является группа узких полос на частоте $1000-1125 \text{ см}^{-1}$, соответствующая колебаниям связи $\text{C}-\text{O}$ в первичных и вторичных спиртах.

На ИК-спектре извлечения, полученного с применением 40%-ого водного раствора глубокого эвтектического растворителя, состоящего из бетаина гидрохлорида и пропиленгликоля в соотношении 1:3, в качестве экстрагента (рисунок 13), видна широкая полоса в области $3000-3500 \text{ см}^{-1}$, соответствующая колебаниям связи $\text{O}-\text{H}$ в составе гидроксильных групп, которые могут принадлежать как органическим молекулам, относящимся к классу спиртов, фенолов или карбоновых кислот, так и молекулам воды. Максимумы поглощения при частотах $2980, 2950, 2880 \text{ см}^{-1}$ характерны для метильных групп $-\text{CH}_3$. Плечо при 1730 см^{-1} характеризует валентные колебания $\text{C}=\text{O}$ карбоксильной группы, а максимум при 1650 см^{-1} связан с поглощением кетогруппы, которая присутствует в составе флавоноидов. Присутствие нескольких пиков при частотах $1400-1480 \text{ см}^{-1}$ характерно для метиленового фрагмента $-\text{CH}_2-$. Полосы при частотах 1270 и 1220 см^{-1} характерны для гидроксильной группы в составе фенолов, а максимум поглощения при 1270 см^{-1} наблюдается для $\text{C}-\text{O}$ связи в простых эфирах. Кроме того, характерна полоса при 1130 см^{-1} , соответствующая колебаниям гидроксильной группы вторичных спиртов (пропиленгликоль). Наличие максимума поглощения при частоте 1070 см^{-1} , характеризующего валентные колебания $\text{C}-\text{N}$ связи, скорее всего, указывает на наличие в анализируемом образце бетаина гидрохлорида.

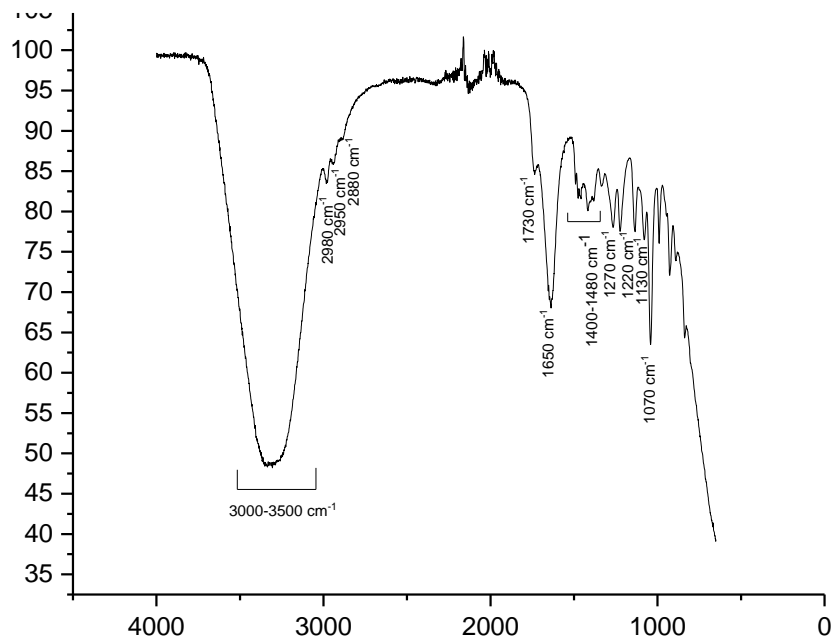


Рисунок 13 - ИК-спектр извлечения на основе ГЭР-20

При сравнении спектров извлечения до и после очистки (рисунок 14) видно, что незначительно увеличивается концентрация гидроксильных групп – ОН (широкая полоса в области $3000\text{-}3500\text{ см}^{-1}$), а также кетогрупп и карбоксильных групп (максимумы при 1650 и 1730 см^{-1} соответственно). Но качественный состав извлечения до и после очистки практически не меняется. Следовательно, очистка не позволяет отделить экстрагент (бетаина гидрохлорид и пропиленгликоль) от полученной вытяжки, о чем свидетельствует наличие полос той же интенсивности при частотах $1000\text{-}1100\text{ см}^{-1}$, что соответствует колебаниям связи С-О в первичных и вторичных спиртах (пропиленгликоль) и 1070 см^{-1} (валентные колебания С-N связи бетаина гидрохлорида).

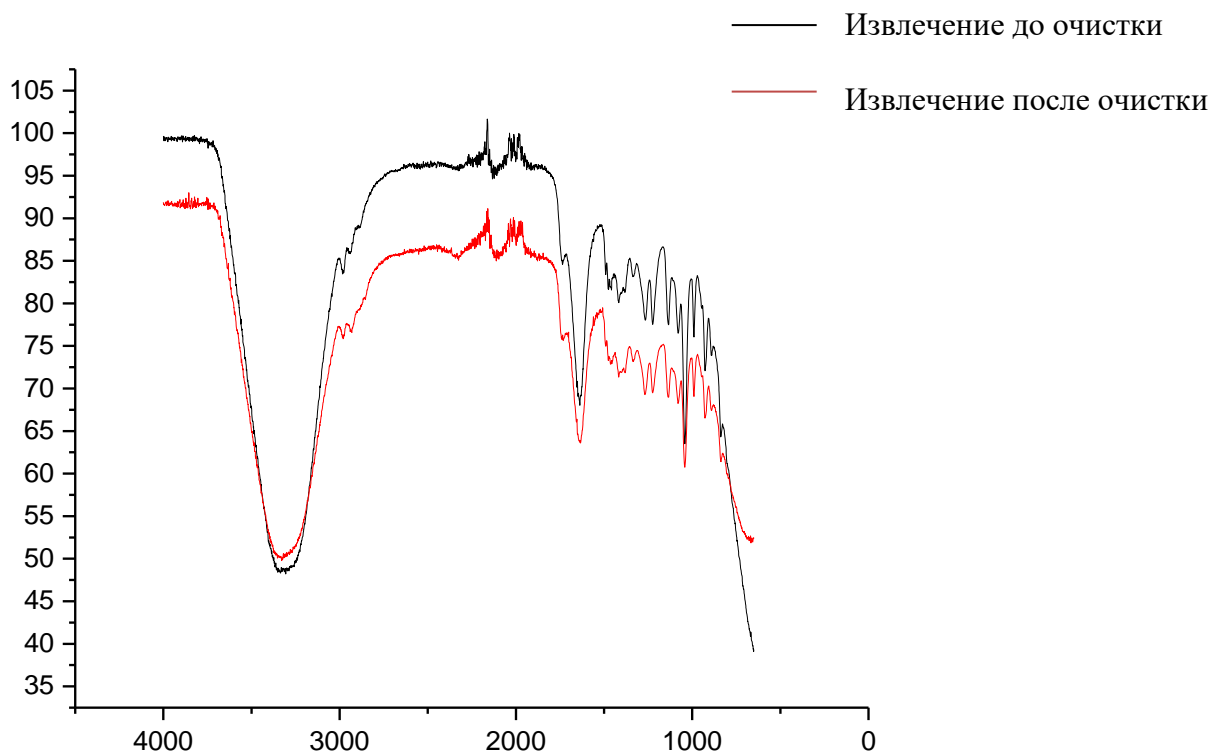


Рисунок 14 - ИК-спектры извлечения до и после очистки

После очистки извлечение высушивали под вакуумом для удаления остатков летучих растворителей до получения вязкой структуры. На рисунке 15 видно, что спектры извлечения после очистки хлороформом и диэтиловым эфиром практически совпадают, что говорит об отсутствии различий в способах очистки.

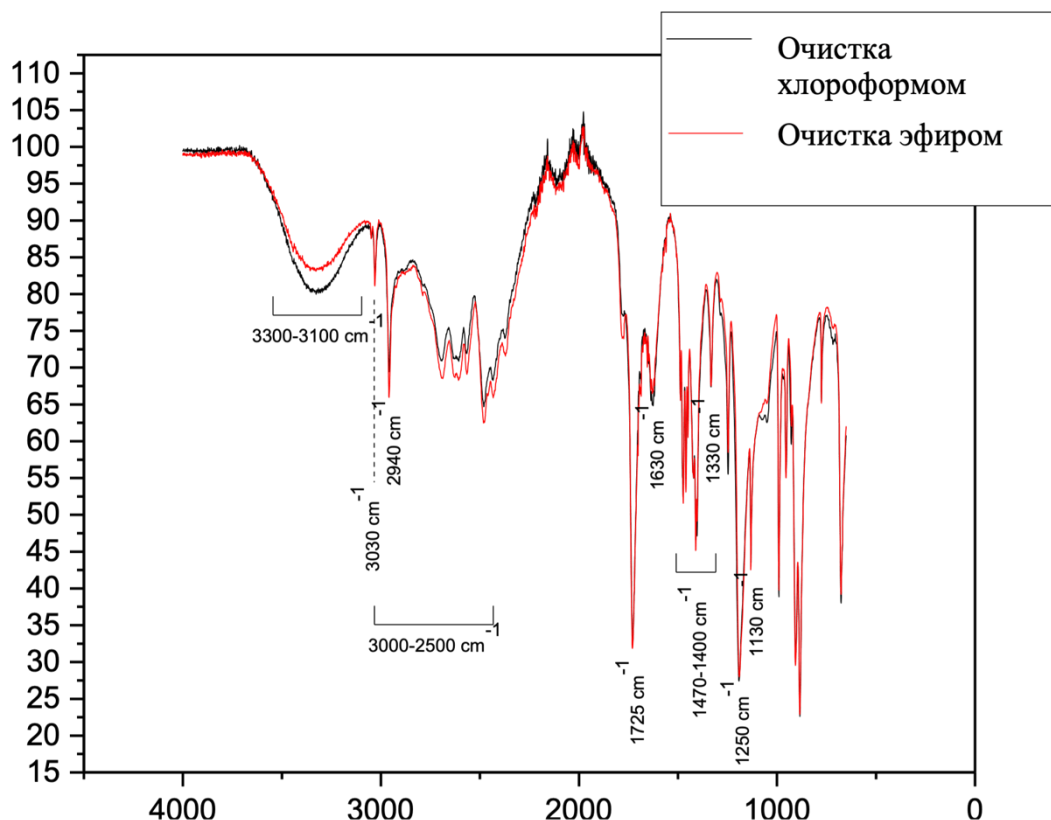


Рисунок 15 - ИК спектры извлечения после очистки и высушивания

При наложении ИК-спектров очищенного извлечения после вакуумной отгонки и бетаина гидрохлорида видно, что присутствие последнего сохраняется в конечном продукте (рисунок 16). Это можно наблюдать по совпадению полос в области $2500-3000\text{ см}^{-1}$, соответствующим валентным колебаниям О-Н карбоксильной группы, которые перекрываются с валентными колебаниями С-Н в составе метильных групп $-\text{CH}_3$; по полосе при частоте 3030 см^{-1} , характерной для карбоксильной группы $-\text{COOH}$, и по наличию максимума поглощения при частоте 1070 см^{-1} , характерного для валентных колебаний С-N связи бетаина гидрохлорида.

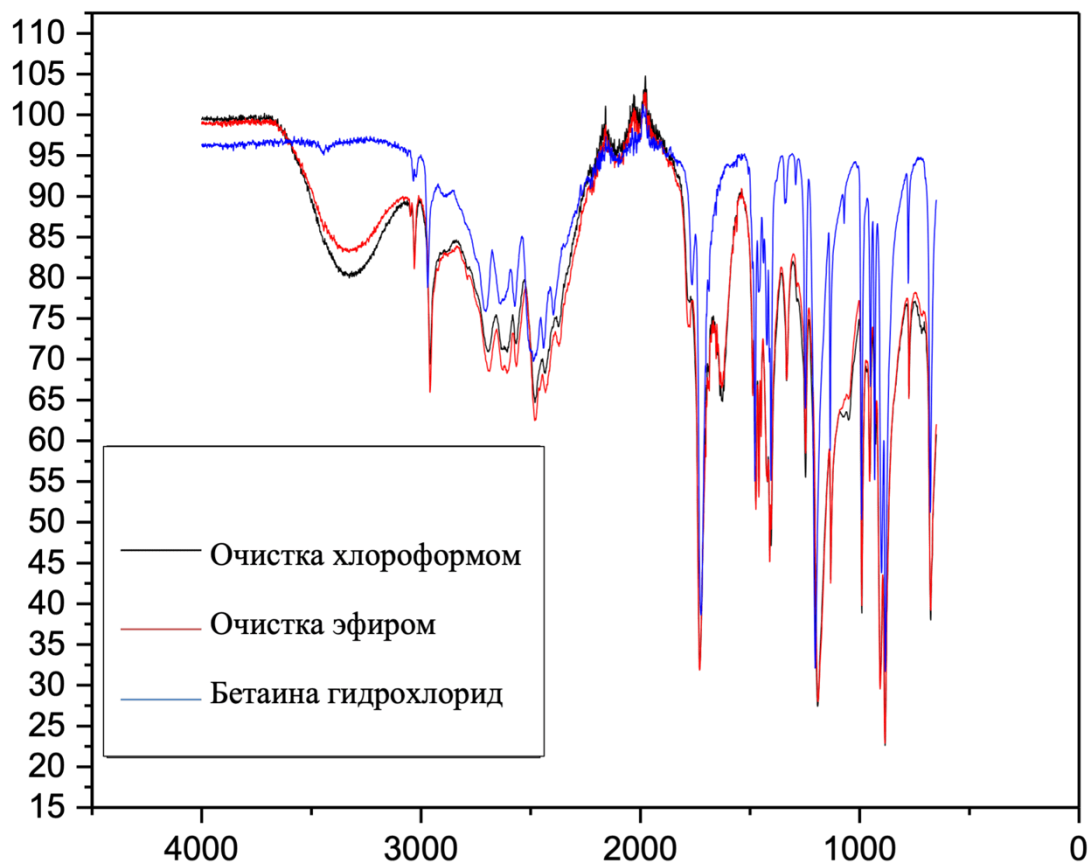


Рисунок 16 - ИК спектры извлечения и бетаина гидрохлорида

При наложении ИК-спектров очищенного извлечения после вакуумной отгонки и пропиленгликоля-1,2 (рисунок 17) видно, что характерные полосы совпадают. В частности, на спектре извлечения также присутствует выраженная группа узких полос на частоте $1000-1125\text{ см}^{-1}$, соответствующая колебаниям связи С-О в первичных и вторичных алифатических спиртах и характерная для пропиленгликоля. Следовательно, пропиленгликоль присутствует в извлечении и после очистки.

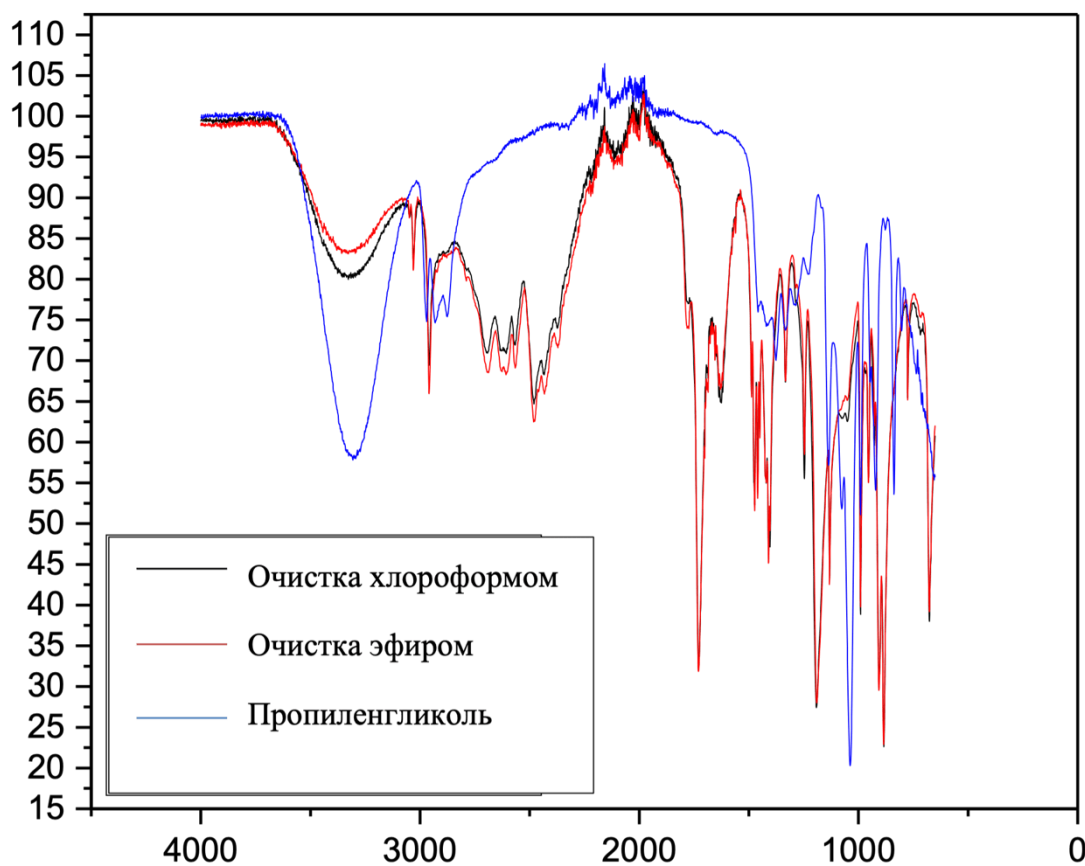


Рисунок 17 - ИК спектры извлечения и пропиленгликоля

Проведенный анализ показал, что очистка извлечения с помощью хлороформа или диэтилового эфира, равно как и удаление экстрагента под вакуумом, неэффективны.

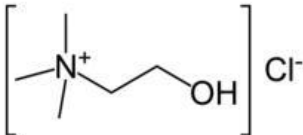
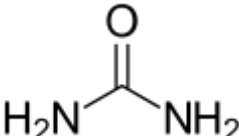
Таким образом, некоторые из применяемых нами веществ (ПЭГ-400, глицерин, пропиленгликоль, щавелевая кислота) при дальнейшем рассмотрении на предмет применения в составе ГЭР показали свою несостоятельность: данные вещества трудноотделимы от экстрагированных биологически активных веществ, они практически не поддаются отгонке, а извлечения - очистке традиционными методами, и, что наиболее важно, они не являются безопасными для человека и обладают токсическим действием на организм. Кроме того, традиционные способы очистки полученных извлечений неэффективны, трудны, требуют последующего контроля остаточного количества экстрагента, наносят вред окружающей среде (жидко-жидкостная экстракция), а применение новых более технологических методов невыгодно с точки зрения недостаточно высокой

экстракционной способности вышеприведенных составов ГЭР и необходимости дальнейшего контроля возможных примесей из-за применения небезопасных исходных соединений в качестве компонентов ГЭР. Именно поэтому целью нашей дальнейшей работы стал поиск нового, более эффективного ГЭР для извлечения флавоноидов из оригинальной растительной композиции, для которого поиск высокотехнологичных методов удаления экстрагента и очистки представлял бы интерес и был целесообразен в связи с увеличенным выходом БАВ из сырья. В качестве акцептора протонов был выбран холина хлорид. Холина хлорид запрещен в качестве добавки в пищевую и косметическую продукцию, но по данным литературы обладает высоким потенциалом к образованию экспериментальных эвтектических смесей.

4.6. Глубокие эвтектические растворители на основе холина хлорида как перспективные экстрагенты флавоноидов из модельной растительной композиции

Далее в качестве акцептора протона в составе ГЭР был выбран холина хлорид. В качестве доноров протонов использовались вещества различной химической структуры. Характеристика веществ, не упомянутых ранее, приведена в таблице 10.

Таблица 10 - Характеристика компонентов ГЭР

Вещество	Характеристика	Структурная формула
Холина хлорид	Кристаллический порошок белого цвета, легко растворим в воде - 65 г / 100 мл, М (молекулярная масса) = 139,6. $T_{пл} = 302$ °С. Холина хлорид запрещен в качестве добавки в пищевую и косметическую продукцию.	
Мочевина	Бесцветные кристаллы без запаха. Хорошо растворима в полярных растворителях (растворимость в воде 51,8 г / 100 мл), при снижении полярности растворителя	

Продолжение таблицы 10

Вещество	Характеристика	Структурная формула
	растворимость падает; нерастворима в неполярных растворителях (алканах, хлороформе). М (молекулярная масса) = 60,07. $T_{пл} = 132,7$ °С. Используется только в составе средств для наружного применения, не для приема внутрь.	
Фруктоза	Бесцветные кристаллы в виде призм или игл. Растворима в воде, пиридине, хинолине, ацетоне, метаноле, этаноле, ледяной уксусной кислоте. Её растворимость в воде выше, чем у других сахаров и составляет 4 г на 1 г воды при 25 °С. М (молекулярная масса) = 180,16. $T_{пл} = 103-105$ °С.	

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 °С 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.

В результате эксперимента было получено 4 ГЭР различного состава, приведенного в таблице 11. Все они представляют собой жидкости, однако их вязкость, степень прозрачности и цвет различаются.

Таблица 11 - Вторые составы экспериментальных ГЭР.

Наименование	Компонент			Мольное соотношение	Описание
	1	2	3		
ГЭР 22	Холина хлорид	Молочная кислота	-	1:2	Прозрачная жидкость желто-оранжевого цвета
ГЭР 23	Холина хлорид	Глюкоза	Вода	2:1:1	Прозрачная жидкость светло-желтого цвета
ГЭР 24	Холина хлорид	Мочевина	-	1:2	Прозрачная бесцветная жидкость

Продолжение таблицы 11

ГЭР 25	Холина хлорид	Фруктоза	Вода	2:1:1	Прозрачная жидкость светло-коричневого цвета
--------	---------------	----------	------	-------	--

Методики и условия экстрагирования аналогичны применяемым ранее и описанным в пункте 4.3. Экстракцию производили 50 %-ым водным раствором соответствующего ГЭР.

4.7. Результаты и обсуждение процесса экстракции флавоноидов с использованием вторых экспериментальных составов ГЭР

4.7.1. Влияние состава ГЭР на эффективность экстракции БАВ

Влияние состава ГЭР на эффективность экстракции БАВ из растительной композиции была продемонстрирована проведенным экспериментом. Вязкость изготовленных ГЭР снижена их разбавлением 50 % воды в массовом отношении. В качестве акцептора протона во всех используемых ГЭР выступал холина хлорид.

Как было продемонстрировано ранее [57], экстрагирующая способность ГЭР зависит от их состава, в частности от определенного донора протонов. Одним из многочисленных факторов, влияющих на свойства образующегося ГЭР, является способность одного из его компонентов отдавать H^+ . Это зависит от химической структуры молекулы определенного вещества. Структурные формулы компонентов ГЭР представлены в таблице 10.

Другим немаловажным фактором является рН образующегося ГЭР. Целевые экстрагируемые соединения – флавоноиды. Данные вещества с химической точки зрения являются гидроксипроизводными флавона, обладающими слабыми кислотными свойствами. Следовательно, ГЭР, имеющие большее значение рН (менее кислую среду), должны эффективнее извлекать флавоноиды из растительного материала.

Таким образом, ГЭР, сочетающий в себе оптимальные физико-химические свойства, сбалансированные характеристики кислотности среды и способности

к отдаче протонов, будет являться наилучшим экстрагентом для выбранной растительной композиции.

Как видно из результатов проведенного эксперимента (таблица 12, рисунок 18), наиболее эффективным экстрагентом для извлечения флавоноидов из модельной растительной композиции является ГЭР-23, состоящий из холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1. 50 %-ый водный раствор данного ГЭР способен извлечь $13,04 \pm 0,23$ мг/г сухого сырья флавоноидов в пересчете на рутин, что составляет 123 % от содержания флавоноидов, извлекаемых с применением 70 %-ого этилового спирта в качестве экстрагента при таких же условиях и параметрах и взятого в качестве стандарта.

Таблица 12 - Влияние состава экстрагента на извлечение флавоноидов

Экстрагент*	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин (мг/г сухого сырья)
ГЭР 22	$9,22 \pm 0,13$
ГЭР 23	$13,04 \pm 0,4$
ГЭР 24	$8,57 \pm 0,11$
ГЭР 25	$7,87 \pm 0,15$
Этанол 70%	$10,60 \pm 0,80$
Этанол 96%	$7,10 \pm 0,46$
Вода	$3,50 \pm 0,24$

*В качестве экстрагента применялись 50 %-ые водные растворы соответствующих ГЭР

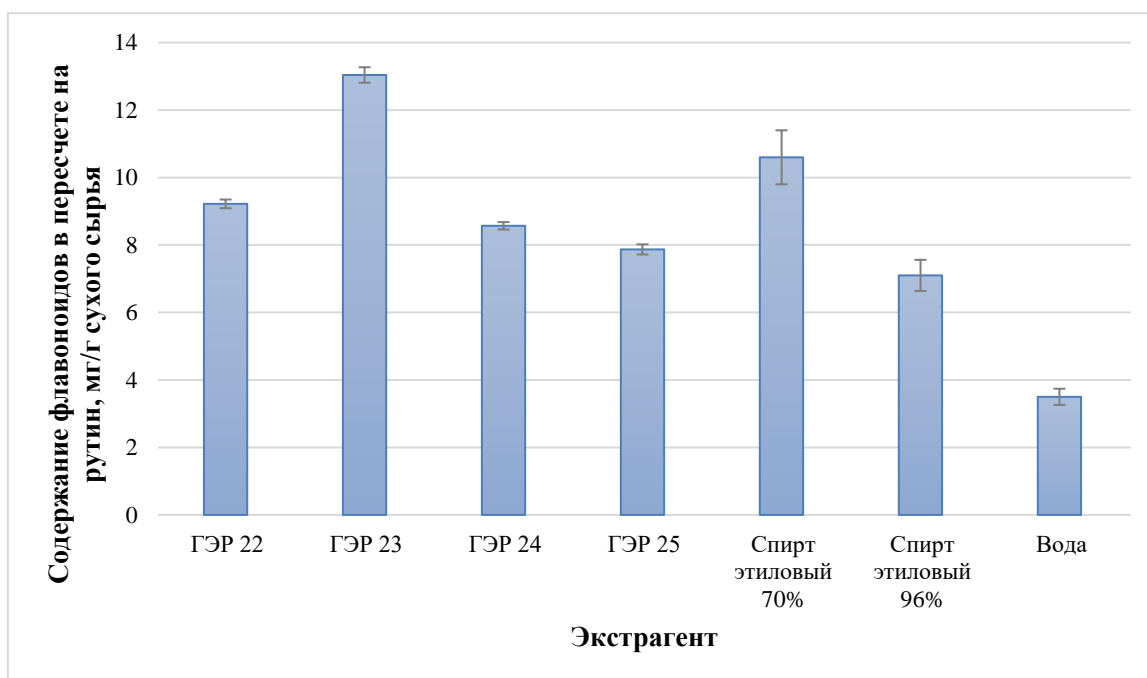


Рисунок 18 - Содержание флавоноидов (мг/г), извлекаемое с применением различных экстрагентов*

*В качестве экстрагента применялись 50 %-ые водные растворы соответствующих ГЭР

4.7.2. Влияние степени разбавления ГЭР на эффективность экстракции БАВ

В связи с тем, что образовавшиеся ГЭР обладают высокой вязкостью, они не могут в нативном виде быть использованы в качестве экстрагента биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья из-за ограничения смачивания компонентов жидкостью и малой скорости диффузии. На основании этого нами были изготовлены водные растворы выбранного экстрагента – 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 от процентного содержания воды в экстрагенте представлены на рисунке 19 и отражены в таблице 13.

Как видно из проведенного эксперимента, оптимальное содержание воды в составе экстрагента – 50 %.

Таблица 13 - Влияние степени разбавления водой на извлекающую способность ГЭР

Включенный ГЭР	Содержание воды в составе растворителя (м/м), %	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин (мг/г сухого сырья)
ГЭР 23 (холина хлорид, глюкоза, вода)	10	4,81 ± 0,16
	30	9,11 ± 0,23
	50	13,04 ± 0,4
	70	5,49 ± 0,31

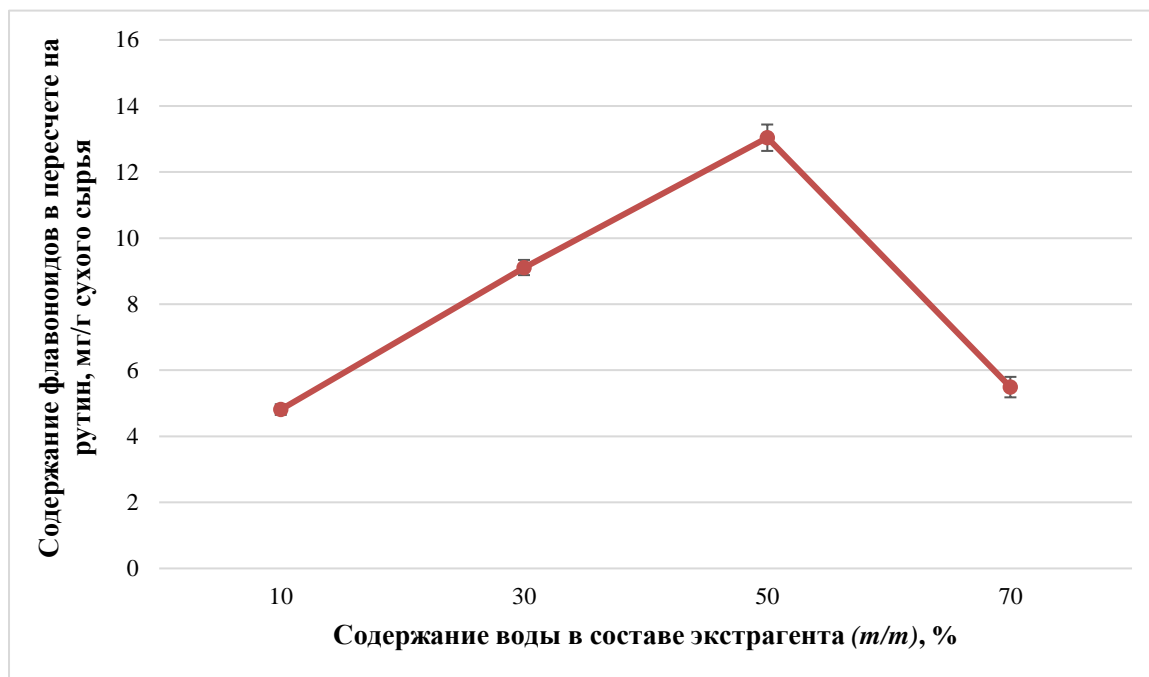


Рисунок 19 - Зависимость извлекающей способности ГЭР 23 от содержания воды

4.7.3. Влияние температуры на процесс экстракции флавоноидов

Чтобы определить оптимальную температуру экстракции, была осуществлена экстракция флавоноидов из растительной композиции при температурах 50, 60, 70 и 80 °С с использованием 50 %-ого водного раствора ГЭР-23 в качестве экстрагента. Эффект, оказываемый температурой на извлечение БАВ, представлен в таблице 14 и на рисунке 20.

Таблица 14 - Влияние температуры экстракции на извлечение флавоноидов.

Включенный ГЭР*	Температура, °С	Содержание флавоноидов в пересчете на рутин (мг/г сухого сырья)
ГЭР 23 (холина хлорид, глюкоза, вода)	50	7,85 ± 0,18
	60	13,04 ± 0,4
	70	11,03 ± 0,2
	80	6,58 ± 0,32

*В качестве экстрагента применялись 50 %-ые водные растворы соответствующих ГЭР

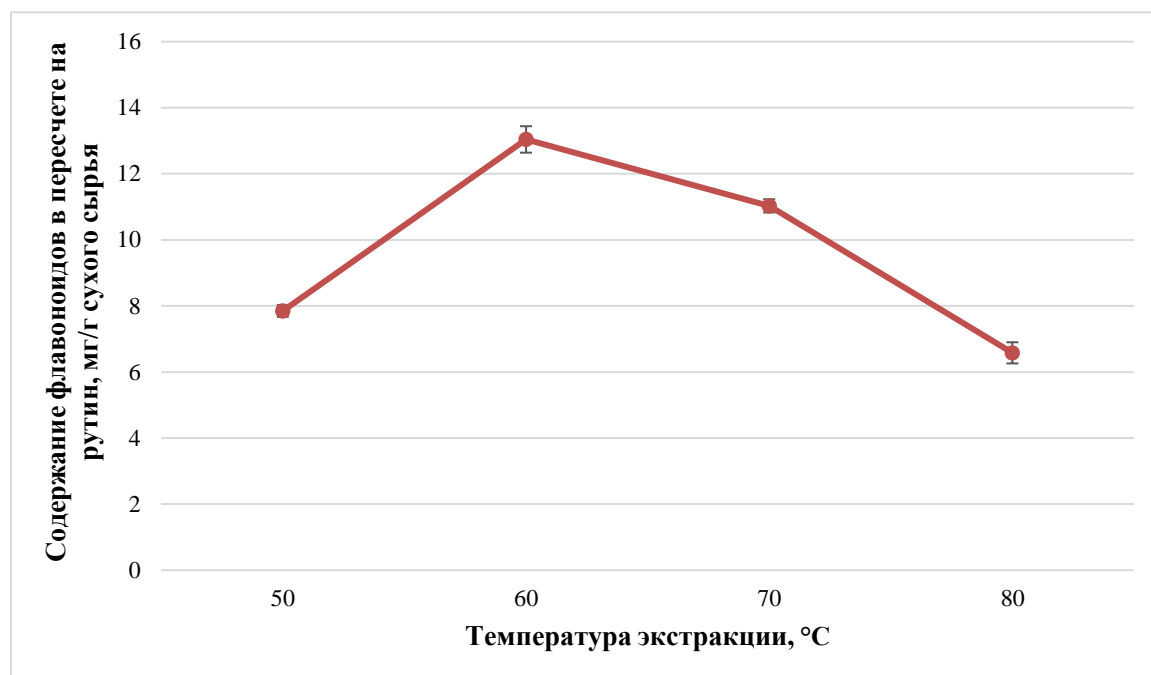


Рисунок 20 - Содержание флавоноидов (мг/г сухого сырья), извлекаемое с помощью 50 %-ого водного раствора ГЭР-23 при различных температурах

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.

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 ± 0,23 мг/г (относительно массы сухого сырья) флавоноидов в пересчете на рутин [11].

4.7.4. Анализ извлечения методом поляриметрии

Изучение извлечения, полученного с помощью 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1, методом поляриметрии проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV издания (ОФС.1.2.1.0018.15 «Поляриметрия»). Данный инструментальный метод способен идентифицировать соединения по характерному для них углу оптического вращения.

Пробоподготовка извлечения к анализу представлена на рисунке 21. Результаты проведенного анализа извлечения приведены в таблице 15.

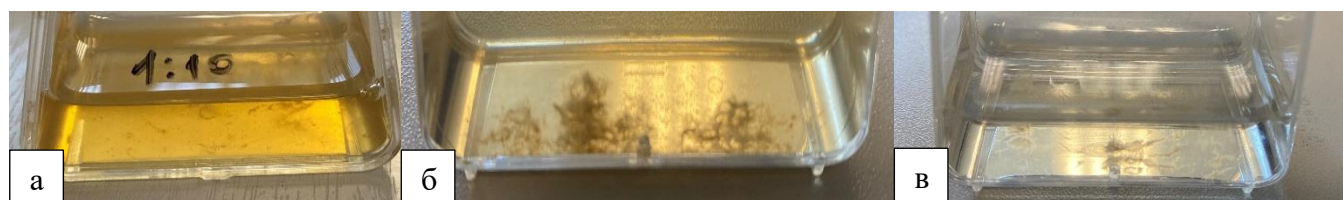


Рисунок 21 - Пробоподготовка образцов извлечения, полученного из растительной композиции с помощью 50%-ого водного раствора ГЭР-23, в различных разведениях (до фильтрования): а – разведение 1 : 10; б – разведение 1 : 40; в – разведение 1 : 100.

Таблица 15 - Результаты поляриметрии (n=5)

Анализируемые пробы	Угол оптического вращения, α° (среднее из 5 измерений)					
	Без разведения	Разведение 1:5	Разведение 1:10	Разведение 1:20	Разведение 1:40	Разведение 1:100
50%-ый водный раствор ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 (относительно дистиллированной воды в качестве фона)	+15.1507	+2.5027	+1.3483	+0.6957	+0.3573	+0.1514
Извлечение, (в качестве фона использовали экстрагент)	-60.5056	-40.6186	-20.5134	-22.5335	-1.4069	-0.1272
Извлечение после фильтрования (бумажный фильтр с размерами пор 5-8 мкм)	×	×	-0.9525	-0.4027	-0.2040	-0.0668

Как видно из полученных данных, оптические свойства извлечения отличны от таковых самого экстрагента. Таким образом, в составе извлечения имеются оптически активные вещества, биологические соединения, имеющие хиральные центры, что говорит об экстрагирующей способности ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды и подтверждает его возможность извлекать БАВ из растительного сырья.

4.7.5. Определение pH извлечения

pH извлечения определяли с помощью pH-метра лабораторного pH-150 МИ. Было установлено, что pH ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды (50 %-ый водный раствор) составляет 5,96; pH извлечения из растительной композиции, полученного с помощью 50 %-ого водного раствора ГЭР-23 – 5,47. Следовательно, в процессе экстракции в состав извлечения вошли БАВ кислой природы, что и определило снижение pH исходного экстрагента. Это может являться еще одним косвенным доказательством экстрагирующей способности 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1.

4.7.6. Характеристика извлечения

Процессуальная схема получения полупродукта – извлечения из модельной растительной композиции – представлена на рисунке 22; технологическая схема получения полупродукта – извлечения из модельной растительной композиции – представлена на рисунке 23; технологическая инструкция по получению полупродукта – эвтектического извлечения – представлена в Приложении Б

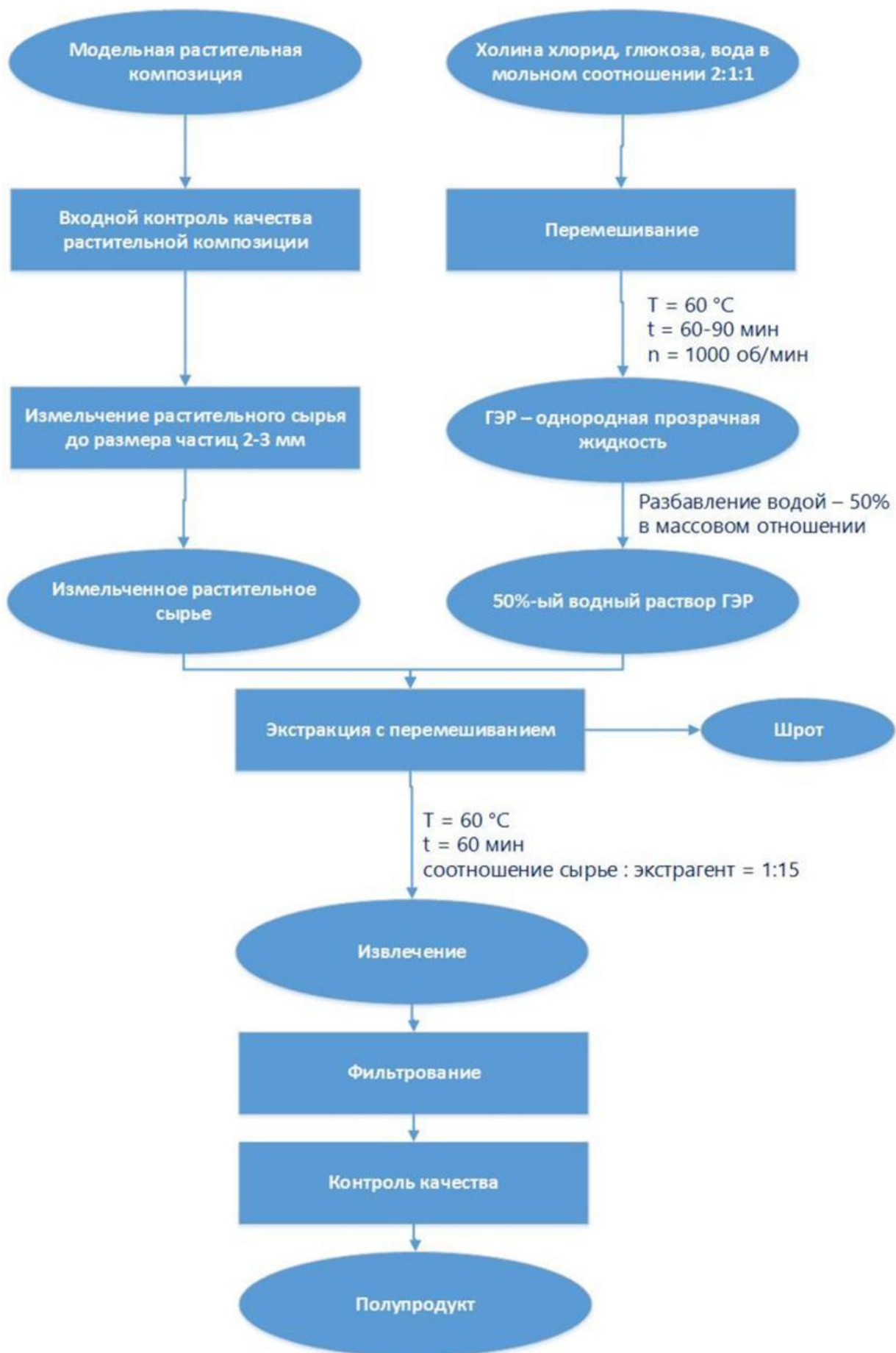


Рисунок 22 - Процессуальная схема получения полупродукта – извлечения из модельной растительной композиции

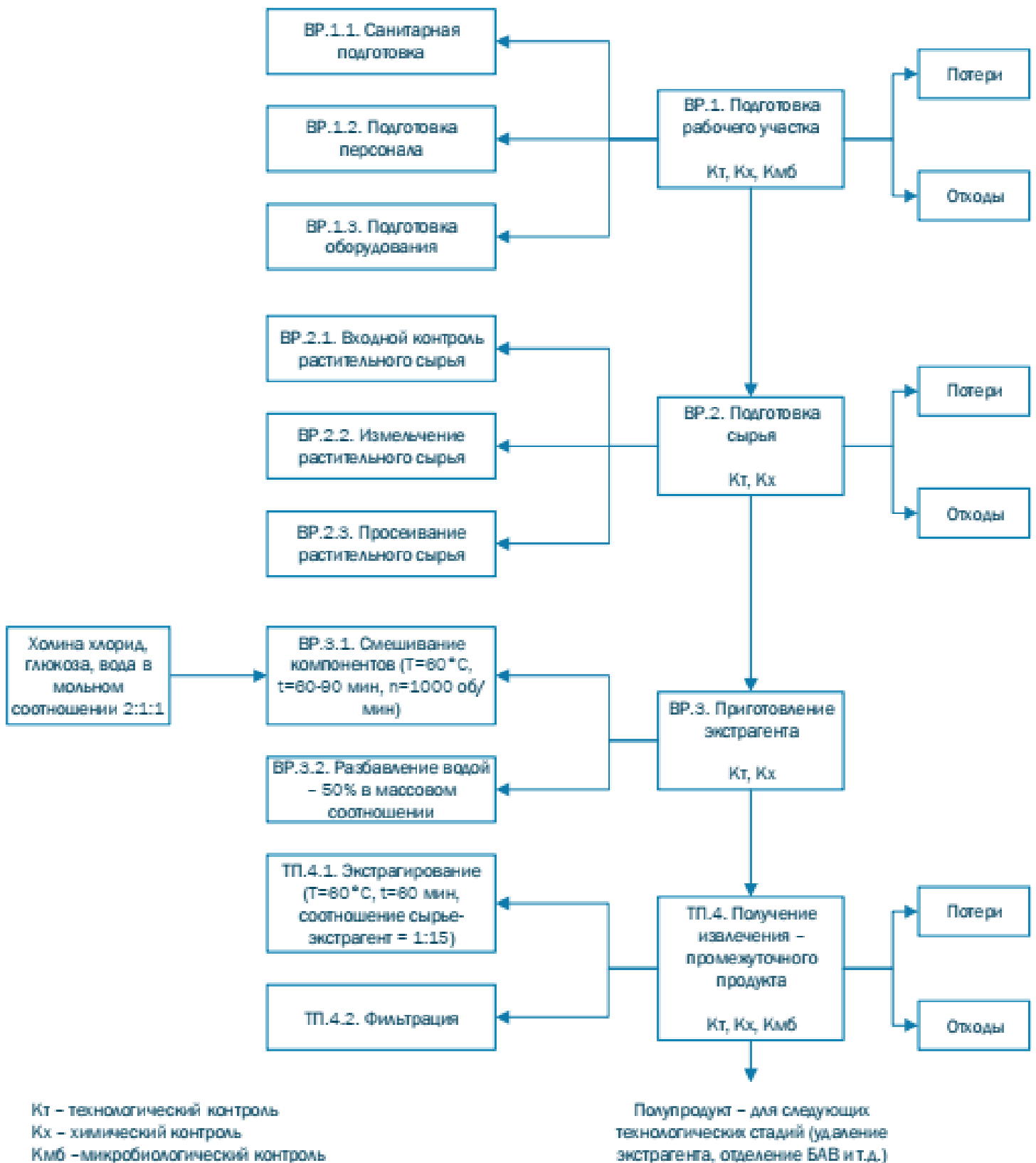


Рисунок 23 - Технологическая схема получения полупродукта – извлечения из модельной растительной композиции

Проект спецификации показателей качества полупродукта – извлечения из модельной растительной композиции – приведен в таблице 16.

Таблица 16 - Спецификация показателей качества полупродукта – извлечения из модельной растительной композиции (проект)

Тест	Метод	Полученные значения
Описание	ГФ XIV Визуально	Прозрачная густая жидкость темно-коричневого цвета с характерным запахом
Подлинность	ГФ XIV ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография»	Наличие характерных пиков на хроматограмме
рН	ГФ XIV ОФС 1.2.1.0004.15 «Ионометрия», метод 3	От 5,4 до 5,5
Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, % (г/100 мл), не менее	ГФ XIV ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»	0,077 ± 0,02
Хранение	В защищенном от света месте при температуре от 15 °С до 25 °С	

Сотрудники отдела токсикологии ФГБНУ ВИЛАР провели эксперимент по изучению токсикологического профиля ГЭР, состоящего из холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 (ГЭР-23), а также полупродукта - извлечения из модельной растительной композиции, полученного с использованием 50%-ого водного раствора данного ГЭР в качестве экстрагента. Протокол изучения острой токсичности ГЭР-23 и извлечения на его основе приведен в Приложении В.

Результаты эксперимента продемонстрировали наличие токсичности *in vivo* как у самого ГЭР, так и у полученного на его основе извлечения. Картина интоксикации включала возбуждение, судороги и гибель животных (мыши-самцы линии BALB/c). Следовательно, полученное извлечение представляет собой только лишь промежуточное соединение, полупродукт, который не может быть использован без дальнейшего удаления экстрагента (ГЭР) из-за

присутствия токсикологического профиля у глубоких эвтектических растворителей.

4.7.6. Методы дальнейшей очистки и удаления экстрагента

Свойства, характеристики ГЭР и их влияние на живые организмы (так, уже имеется информация о токсичности ГЭР различных составов (холина хлорид : глюкоза, холина хлорид : фруктоза [61], холина хлорид : мочевины [49, 53] и др.) в экспериментах на животных) требуют тщательного изучения. Необходимо глубокое исследование физико-химического и токсикологического профиля полученного ГЭР и извлечения на его основе, а также вариантов и методов удаления экстрагента, для возможности рассмотрения дальнейшего применения глубоких эвтектических растворителей в различных отраслях науки. Далее предложены возможные методы удаления ГЭР из полученного извлечения.

Неоспоримое преимущество ГЭР – их малая летучесть – в то же время является и явным затруднением при удалении экстрагента. На сегодняшний день существует лишь малое число работ, посвященных возможным методам отделения ГЭР от экстрагируемых соединений. Наиболее часто встречающиеся – это жидко-жидкостная экстракция с использованием другого растворителя, твердо-жидкостная экстракция с использованием твердых мембран различной полярности [92] и преципитация после добавления антирастворителя.

Жидко-жидкостная экстракция с использованием этанола касательно ГЭР может поставить под вопрос целесообразность их применения в качестве экстрагентов, так как в процессе получения БАВ на конечной стадии используется этиловый спирт. В связи с тем, что цель работы – поиск экстрагента, отвечающего параметрам «зеленой» химии, не приносящего вреда экологии, мы отказались от дальнейшего рассмотрения данного метода.

Твердофазная экстракция – один из наиболее эффективных методов выделения БАВ из извлечения после процесса экстракции с применением ГЭР с выходом действующих веществ до 98% [92]. Подбирая модели твердых мембран для каждого класса БАВ, можно добиться наилучшей эффективности процесса.

С учетом того, что экстрагент – ГЭР – является возобновляемым и его можно использовать повторно, выделение БАВ с использованием нового класса экстрагентов будет являться экономически выгодным [74]. Поэтому дальнейший поиск твердофазной мембраны с оптимальными параметрами для эффективного выделения БАВ из полученного извлечения – задача следующих исследований.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. Разработаны экспериментальные составы глубоких эвтектических растворителей с использованием различных веществ в качестве донора и акцептора протона и протестированы на предмет извлекающей способности флавоноидов из модельной растительной композиции.
2. Обоснован выбор состава экспериментального образца ГЭР (холина хлорид, глюкоза и вода в мольном соотношении 2:1:1) по эффективности экстракции флавоноидов из модельной растительной композиции, в состав которой входят трава пустырника, трава зверобоя, трава Melissa и трава чабреца.
3. Экспериментальным путем установлено оптимальное содержание воды в составе экстрагента, обеспечивающее приемлемую вязкость и в то же время достаточную эффективность экстракции, – 50 %.
4. На основе экспериментальных данных обоснована оптимальная температура экстракции, обеспечивающая эффективность процесса и сохранность термолабильных соединений, - 60 °С.
5. Установлено, что с помощью 50 %-ого водного раствора ГЭР, состоящего из холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1, удается извлечь 13,04 мг/г (относительно массы сухого сырья) флавоноидов в пересчете на рутин.
6. Методом поляриметрии показана оптическая активность биологически активных соединений, имеющих хиральные центры, что говорит об экстрагирующей способности 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 и подтверждает его возможность извлекать БАВ из растительного сырья.
7. 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.

8. На основании установленного сотрудниками отдела токсикологии ФГБНУ ВИЛАР наличия токсичности *in vivo* как у экстрагента - ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды, - так и у полученного на его основе извлечения описана необходимость дальнейшего удаления экстрагента.
9. С помощью метода ИК-спектрии доказана неэффективность удаления экстрагента – ГЭР – с помощью вакуумной сушки и методом жидко-жидкостной очистки, а также показана нецелесообразность последнего способа ввиду неэкологичности и вреда для окружающей среды. На основе имеющихся научных данных, в связи с необходимостью дальнейшего удаления экстрагента (на основании данных о присутствии токсикологического профиля), предложены перспективные способы отделения экстрагированных веществ от экстрагента: твердофазная экстракция с применением твердых мембран.

**ГЛАВА 5. ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ 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**

5.1. Описание процесса валидации

Объектом валидации является методика 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. Описание методики приведено в главе 2 настоящей работы. Цель валидации - экспериментально подтвердить, что методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин постоянно дает результаты, соответствующие требованиям методологии измерений.

В процессе работы было использовано оборудование, приведенное в таблице 17. Все приборы поверены и имеют документы, свидетельствующие о прохождении метрологической аттестации (сертификаты/ акты/ свидетельства).

Таблица 17 - Оборудование и приборы

Наименование прибора	Модель	Заводской номер
Весы аналитические Vibra Shinko Denshi, класс 2	HRT-220CE	121852240
Весы аналитические AND, класс 2	ER-182A	4703139
Спектрофотометр Shimadzu	UV-1800	A11635271374US
Спектрофотометр Cary	100 Scan Varian	EL 03025636

Для анализа применялись следующие реактивы:

- рутин (Sigma-Aldrich, кат. номер: 153-18-4 ($\geq 95.0\%$));
- вода очищенная (ФС.2.2.0020.18 «Вода очищенная»);

- спирт этиловый (ГОСТ Р 5962-2013);
- алюминия хлорид (Panreac, кат. номер: 7784-13-6);
- кислота уксусная (ГОСТ 61-75 (СТ СЭВ 5375-85)).

При использовании спектрофотометрического метода, основанного на реакции комплексообразования с алюминия хлоридом, происходит bathochromный сдвиг полосы поглощения флавоноидов с 330—350 до 390—410 нм, что позволяет обнаружить искомые действующие вещества инструментальным способом. При добавлении спиртового раствора хлорида алюминия к извлечению, получаемому после экстракции БАВ из экспериментальной растительной композиции, в спектре наблюдался максимум поглощения при 410 нм, который совпал с максимумом поглощения спектра рутина с хлоридом алюминия. Данное наблюдение позволяет сделать вывод о выборе данной длины волны как характеристической при количественном определении содержания флавоноидов.

Квалификация методики (валидация) проводилась по таким параметрам как: специфичность, линейность, правильность, повторяемость и воспроизводимость методики.

5.2. Специфичность методики

Специфичность аналитической методики определяет ее способность достоверно определять тестируемый компонент в присутствии примесных и вспомогательных веществ. Специфичность достигается путем использования стандартных образцов.

Описание испытания:

Проверка соответствия максимума поглощения дифференциальных спектров извлечения и СО рутина, полученных на регистрирующем спектрофотометре в диапазоне длин волн 350-500 нм.

Результаты испытания:

Дифференциальный УФ-спектр суммы флавоноидов извлечения в диапазоне длин волн от 350 до 500 нм (рисунок 24) имеет максимум поглощения

при длине волны 411 нм, что соответствует максимуму поглощения дифференциального спектра раствора стандартного образца рутина, наблюдаемому при длине волны 410 ± 2 нм. При этом, как показано на рисунке 29, 50%-ый раствор ГЭР в чистом виде не имеет максимумов поглощения в данной области спектра, что исключает влияние самого экстрагента на результаты анализа.

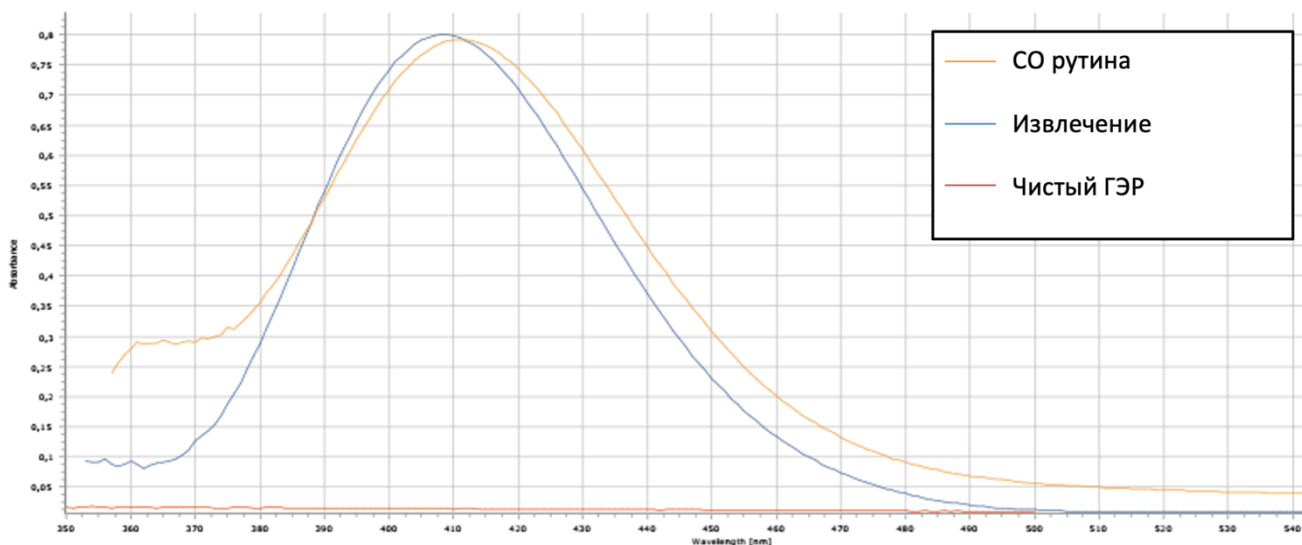


Рисунок 24 - Дифференциальные УФ-спектры комплексов изучаемого извлечения с алюминия хлоридом и СО рутина с алюминия хлоридом

5.3. Контроль линейности методики

Линейная зависимость устанавливается на основании результатов испытаний (определения оптической плотности), которые пропорциональны концентрации анализируемого вещества в образце в пределах аналитической методики. Линейность результатов может быть представлена графически в виде зависимости аналитических сигналов от концентрации вещества (не менее 5).

Критерий приемлемости: методика считается линейной, если коэффициент корреляции (R^2) между рядом полученных значений будет не ниже 0,99.

Описание испытания:

Приготовление раствора стандартного образца (СО) рутина: Около 0,01 г (точная навеска) СО Рутин (Sigma-Aldrich, кат. номер: 153-18-4 ($\geq 95.0\%$)),

предварительно высушенного при температуре 130-135 градусов в течение 3 ч, растворяют в 20 мл 70 % спирта этилового в мерной колбе вместимостью 25 мл и доводят его объем до метки спиртом этиловым 70 %, перемешивают.

Определение линейности проводилось на 7 уровнях концентраций СО рутина в диапазоне 0,1 – 1,0 мг/мл (таблица 18).

Таблица 18 - Результаты испытания линейности методики

№ измерения	Содержание, % от нормируемого значения (около)	Объем аликвоты р-ра СО (рутин), мл	Концентрация СО (рутин), мг/мл	Аналитический отклик (оптическая плотность)
1	40	0,4	0,16	0,135
2	60	0,6	0,24	0,219
3	90	0,9	0,36	0,371
4	110	1,1	0,44	0,500
5	140	1,4	0,56	0,701
6	160	1,6	0,64	0,793
7	190	1,9	0,76	0,908

Коэффициент корреляции составил 0,9916, что соответствует критерию приемлемости линейности (рисунок 25)



Рисунок 25 - Зависимость оптической плотности комплекса СО рутина с $AlCl_3$ от его концентрации

5.4. Контроль правильности (точности) методики

Правильность аналитической методики характеризует близость результатов испытаний, полученных данной методикой, к истинному значению. Показателем правильности методики обычно является значение систематической погрешности. Систематическая погрешность выражается как разность между математическим ожиданием результатов измерений и истинным значением.

Правильность оценивается на основе не менее 9 результатов определений на минимум 3 уровнях концентраций в пределе аналитической области.

Критерий приемлемости: процент восстановления (открываемости) при использовании концентраций 25, 50 и 75 %, скорректированный на 100 %, должен находиться в пределах от 95,0 % до 105,0 %.

Процент восстановления (R):

$$R(\%) = \frac{A}{B} \cdot 100 \% ,$$

где:

R (Recovery) – выход;

A – измеренное содержание;

B – заданный (фактический) уровень.

Описание испытания:

Модельные смеси готовили трех концентраций с содержанием СО рутина 25, 50 и 75 % к значению его содержания в растительной композиции, полученном при использовании 50 %-ого водного раствора ГЭР-23 в качестве экстрагента. Результаты испытаний представлены в таблице 19.

Таблица 19 - Результаты испытания правильности методики

№ п/п	Найдено, мг/г	Добавлено СО, мг	Ожидаемое значение, мг/г	Полученное значение, мг/г	Абсолютная ошибка, мг/г	Выход, %
1.1	13,04	3,26	16,3	16,44	-0,14	100,88
2.1	13,04	6,52	19,56	19,82	-0,26	101,34
3.1	13,04	9,78	22,82	22,16	0,62	97,11
1.2	13,04	3,26	16,3	15,99	0,31	98,12
2.2	13,04	6,52	19,56	19,99	-0,43	102,21
3.2	13,04	9,78	22,82	22,23	0,59	97,43
1.3	13,04	3,26	16,3	15,82	0,48	97,07
2.3	13,04	6,52	19,56	19,73	-0,17	100,85
3.3	13,04	9,78	22,82	22,67	0,15	99,36
Среднее значение выхода, %				99,37		

Показано, что процент восстановления находится в пределах от 97,07% до 102,21% и имеет среднее значение 99,37%, что соответствует требованиям критерия приемлемости.

5.5. Контроль внутрилабораторной прецизионности методики

Прецизионность аналитической методики характеризует степень близости независимых результатов индивидуальных испытаний, полученных в конкретных установленных условиях. Эта характеристика зависит только от случайных факторов и не связана с истинным значением измеряемой величины. Она выражается величиной стандартного отклонения – коэффициентом вариации. Экстремальные показатели прецизионности – сходимость (повторяемость) и воспроизводимость.

Стандартное (среднеквадратичное) отклонение (S) и коэффициент вариации (CV, также известный как относительное стандартное отклонение (RSD)) служат характеристикой случайных погрешностей и используются для оценки сходимости и воспроизводимости измерений. Коэффициент вариации

является отношением среднеквадратичного отклонения к среднеарифметическому значению результатов n измерений:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}{n - 1},$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}{n - 1}},$$

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100\% ,$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x}{n},$$

$$\Delta x = \frac{t_{\lambda;v} \cdot S}{\sqrt{n}},$$

$$F = \frac{S^2_1}{S^2_2}, \quad \text{где } S^2_1 > S^2_2$$

$$\varepsilon(\%) = \frac{\Delta x}{\bar{x}} \cdot 100\% ,$$

где:

x – результат отдельного определения;

\bar{x} – среднее арифметическое всех определений;

n – число определений;

S – стандартное отклонение;

S^2 – дисперсия;

CV – коэффициент вариации;

$t_{\lambda;v}$ – коэффициент Стьюдента;

F – критерий Фишера;

Δx – абсолютная вероятная погрешность отдельного измерения;

ε – относительная вероятная погрешность отдельного измерения

5.5.1. Сходимость методики

Сходимость характеризует степень согласованности результатов измерений (испытаний), полученных с помощью одной и той же методики на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени.

Критерий приемлемости: коэффициент вариации параллельных определений для 6 измерений должно быть не более 5 %.

Описание испытания:

Определения процентного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин проводили в 6 повторностях, одним аналитиком при одних и тех же условиях (реактивы, оборудование, обстановка и др.), в течение короткого промежутка времени. Результаты испытаний отображены в таблице 20.

Таблица 20 - Результаты испытания сходимости методики

№ испытания	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в анализе, мг/г сухого сырья
1	13,10
2	13,26
3	12,75
4	13,04
5	12,82
6	13,29
Среднее значение содержания, мг/г сухого сырья	13,04
S, % (единица измерения испытаний)	0,222
CV, %	1,704
ε, %	1,788

Коэффициент вариации для 6 измерений имеет значение 1,704%, что соответствует требованиям критерия приемлемости.

5.5.2. Воспроизводимость методики

Воспроизводимость характеризует меру совпадения результатов измерений, полученных с помощью одной и той же методики, на идентичных образцах, в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования, относительно длинный промежуток времени между измерениями, отдельные, предположительно идентичные образцы, взятые из одной партии материала.

Критерий приемлемости: определяется коэффициент вариации в каждом из уровней точности. Критерий инструментальной воспроизводимости – не более 1 %, внутрилабораторной воспроизводимости (воспроизводимость, определяемая в условиях, в которых результаты анализа получают по одной и той же методике, на идентичных пробах при вариации всех факторов, формирующих разброс результатов при применении методики анализа в конкретной лаборатории (исполнители, время и др.)) – не более 10 %, межлабораторной - не более 15 % для количественного определения основного компонента (для растительного сырья).

Описание испытания:

Определение внутрилабораторной воспроизводимости методики проводили 2 аналитика на 3 образцах растительной композиции в 3 повторностях каждый, независимо друг от друга. Результаты испытаний представлены в таблице 21:

Таблица 21 - Результаты испытания воспроизводимости методики

Образец	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в анализе, мг/г сухого сырья	
	Аналитик 1	Аналитик 2
	День 1	День 2
1	13,23	12,96
2	13,05	13,22
3	12,85	12,9

Продолжение таблицы 21

Образец	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в анализе, мг/г сухого сырья	
	Аналитик 1	Аналитик 2
	День 1	День 2
4	13,01	13,22
5	12,97	12,98
6	13,12	13,07
7	13,03	13,23
8	12,93	12,79
9	13,09	13,34
Среднее содержание рутина, мг/г сухого сырья	13,03	13,08
S, %	0,111	0,184
CV, %	0,851	1,405
D	0,012	0,034
Критерий Фишера F (95%, f₁=8, f₂=8) =3,44	2,74	

Полученные значения коэффициента вариации при измерении образцов не превышают 10 %, различия между результатами сотрудников статистически незначимы ($F < F_{табл.}$), что позволяет считать внутрилабораторную воспроизводимость результатов приемлемой.

5.5. Заключение по валидации

Полученные экспериментальные данные позволяют оценить методику количественного определения суммы флавоноидов, извлекаемых 50%-ым водным раствором ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды (мольное соотношение 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 %).

Обобщенные результаты представлены в таблице 22.

Таблица 22 - Результаты валидационной оценки методики спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин

Параметр	Критерий валидности	Исследуемая методика
Специфичность	Стандартный образец рутин	Специфична
Сходимость	Коэффициент вариации параллельных определений для 6 измерений $CV \leq 5\%$.	$CV = 1,704\%$
Воспроизводимость	$CV < 10\%$ $t_{\text{табл}} \geq t_{\text{выч}}$	$CV_1 = 0,851\%$ $CV_2 = 1,405\%$ $t_{\text{выч}} = 2,74,$ $(t_{\text{табл}} = 3,44),$ $n=9$
Линейность	$R^2 \geq 0,99$	$R^2 = 0,9916;$ $y = 0,1356x - 0,0243$
Правильность (точность)	Процент восстановления $R \in [95,0\%; 105,0\%]$	$R \in [97,07\%; 102,21\%]$

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Проведена валидация методики количественного определения действующих веществ на 1 г сухого сырья, извлекаемых из растительной композиции с помощью 50%-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1.
2. Установлены параметры специфичности, правильности, повторяемости, воспроизводимости и линейности методики.
3. Полученные экспериментальные данные, а именно:
 - 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 %), -позволяют считать методику 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 в экспериментальной растительной композиции, валидной.

ГЛАВА 6. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ МЕТОДОВ

6.1. Сравнительная характеристика экстрагирующей способности 50 %-ого водного раствора ГЭР-23 и этилового спирта 70 % при оптимальных условиях методом спектрофотометрии

В главе 3 описаны оптимальные условия, обеспечивающие наилучшую экстрагирующую способность для флавоноидов из изучаемой растительной композиции с использованием 70 %-ого этилового спирта в качестве экстрагента. Методом дифференциальной спектрофотометрии показано, что при оптимальном способе экстракции 70 %-ым этиловым спиртом удается извлечь $1,33 \pm 0,02$ %, или $13,30 \pm 0,20$ мг/г (относительно массы сухого сырья) флавоноидов в пересчете на рутин из модельной растительной композиции.

В поставленном нами эксперименте с использованием в качестве экстрагента 50%-ого водного раствора глубокого эвтектического растворителя на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 после оптимизации условий процесса удалось извлечь $1,304 \pm 0,04$ %, или $13,04 \pm 0,4$ мг/г (относительно массы сухого сырья) флавоноидов в пересчете на рутин, что в пределах погрешности сопоставимо с традиционным методом экстракции (рисунок 26).

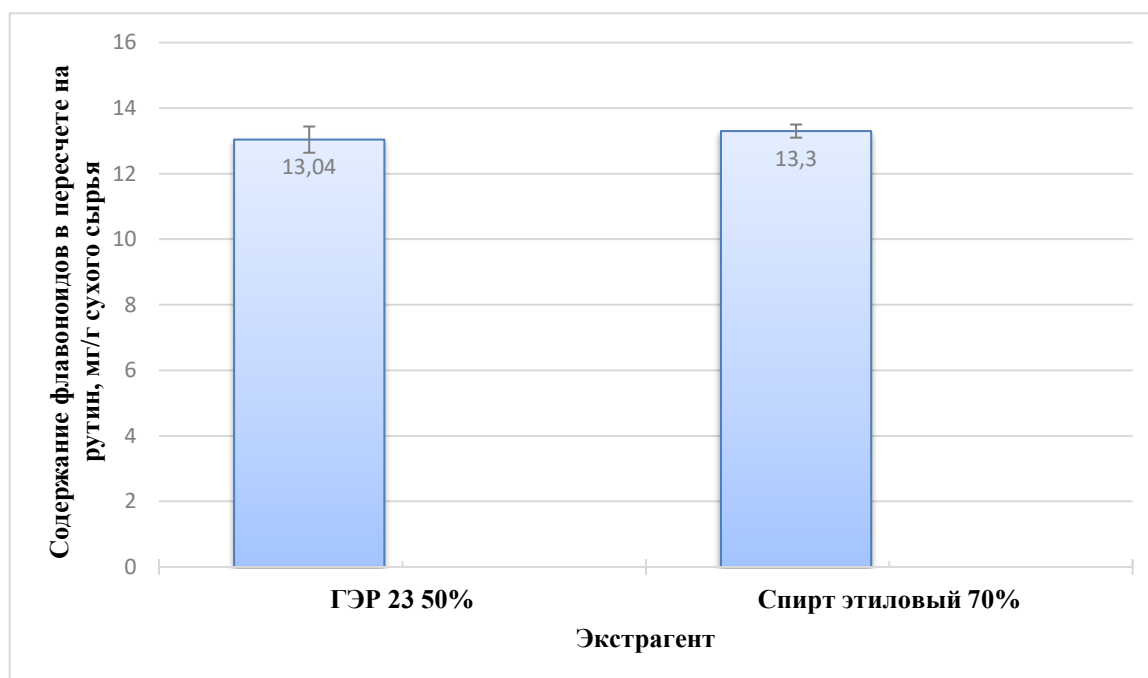


Рисунок 26 - Содержание флавоноидов (мг/г), извлекаемых с применением 50 %-ого водного раствора ГЭР-23 и 70 %-ого этилового спирта в качестве экстрагентов в оптимальных условиях для каждого процесса

6.2. Анализ извлечений методом УЭЖХ-МС/МС

Был проведен анализ полифенольных соединений в составе растительной композиции, состоящей из следующих компонентов:

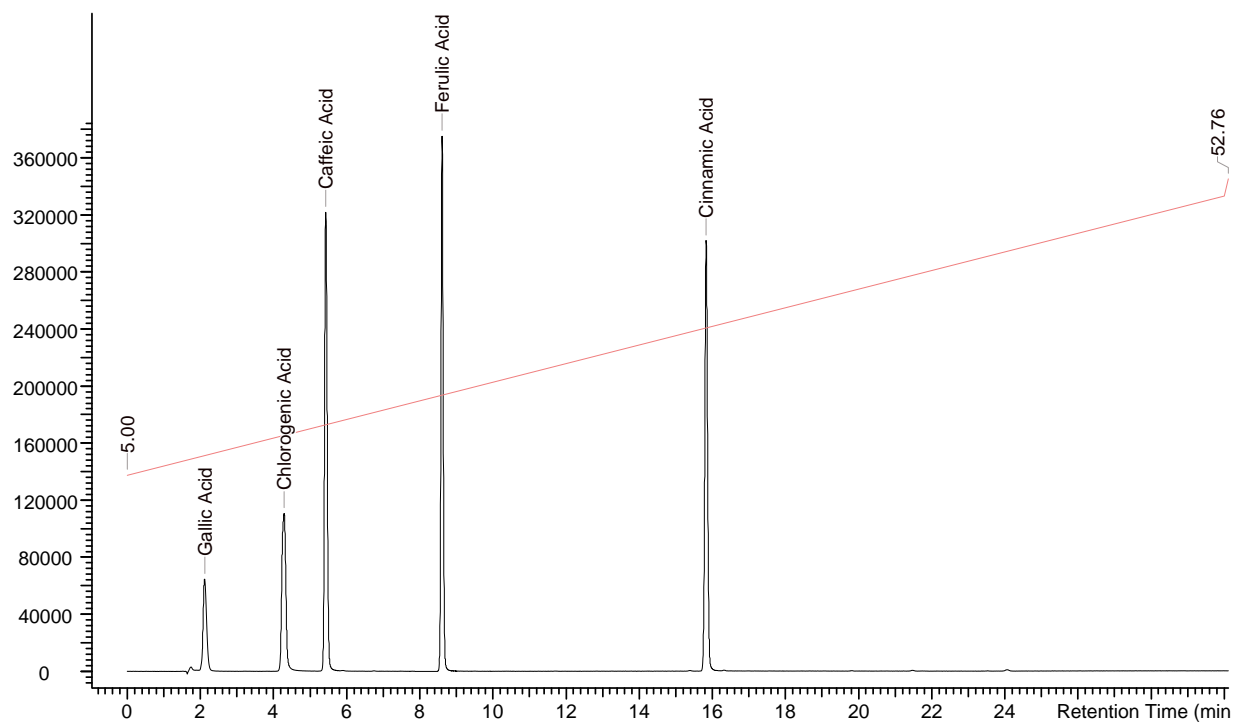
- трава пустырника сердечного (пустырника обыкновенного) (*Leonurus cardiaca L.*) – 40%
- трава зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum L.*) – 25%
- трава мелиссы лекарственной (*Melissa officinalis L.*) – 25%
- трава тимьяна ползучего (чабреца) (*Thymus serpyllum L.*) – 10%, -

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

Стандартные условия и метод хроматографирования приведены в главе 2.

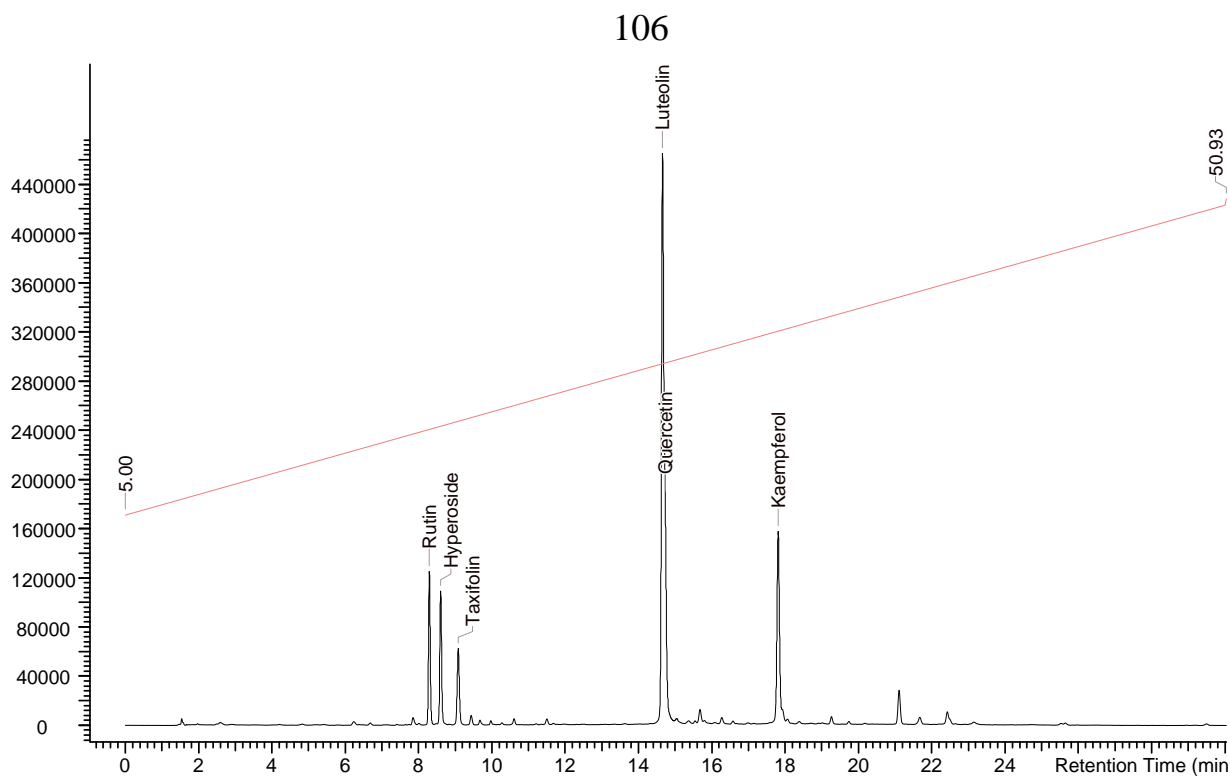
6.2.3. Хроматограмма смеси стандартов

В условиях, описанных в главе 2, были проведены анализы смеси имеющих стандартов 5-ти фенольных кислот и 6 флавоноидов при длинах волн 300 и 320 нм (рисунки 27 и 28).



Name	tR	Peak Area (Y units*ms)	Area Percent (%)	Resolution	Plate Number
Gallic Acid	2.11	4.14e+8	6.95	9.91	2400
Chlorogenic Acid	4.29	8.39e+8	14.10	7.65	6892
Caffeic Acid	5.43	1.59e+9	26.64	25.83	27214
Ferulic Acid	8.61	1.55e+9	26.00	59.15	100927
Cinnamic Acid	15.83	1.57e+9	26.31	-	215677

Рисунок 27 - Хроматограмма смеси стандартов при 300 нм.



Name	tR	Peak Area (Y units*ms)	Area Percent (%)	Resolution	Plate Number
Rutin	8.29	3.97e+8	7.79	3.58	159073
Hyperoside	8.60	3.68e+8	7.23	4.94	152925
Taxifolin	9.08	2.56e+8	5.02	51.59	117465
Luteolin	14.66	2.69e+9	52.77	0.66	171946
Quercetin	14.73	6.15e+8	12.07	35.03	1212552
Kaempferol	17.81	7.70e+8	15.12	-	339105

Рисунок 28 - Хроматограмма смеси стандартов при 320 нм.

Длины волн детекции были выбраны для удовлетворительного отклика всех компонентов смеси.

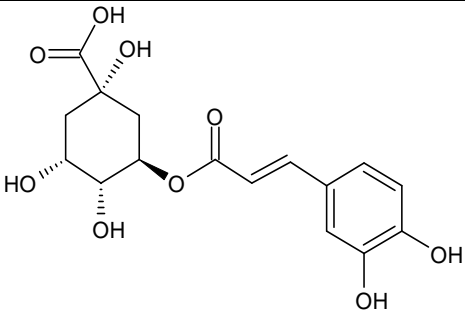
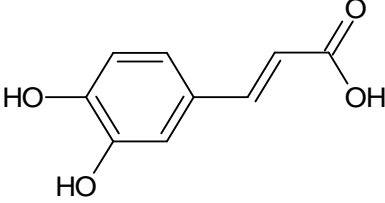
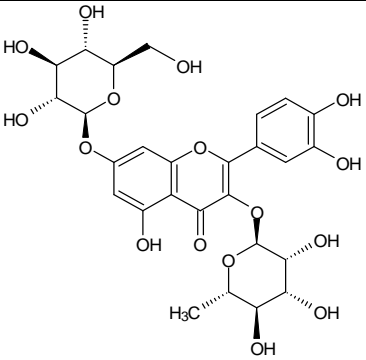
6.2.3. Обсуждение результатов исследования извлечений

На основании масс-спектров при ионизации в позитивном и негативном режимах были предположены молекулярные ионы ($M+H^+$, $M+Na^+$ и $M-H^-$), предложен молекулярный вес компонента, а по фрагментации и УФ-спектрам предположена структура аглюкона, входящего в состав молекулы. В спорных случаях использовалась ожидаемая последовательность выхода компонентов (гидрофобность). Поскольку смесь очень сложная, состоящая из большого числа компонентов, то были собраны данные для пиков, имеющих площадь не менее 1% от суммы всех площадей при 260 и 360 нм, время удерживания не менее 3.0 мин и достаточный отклик на МС-детекторе.

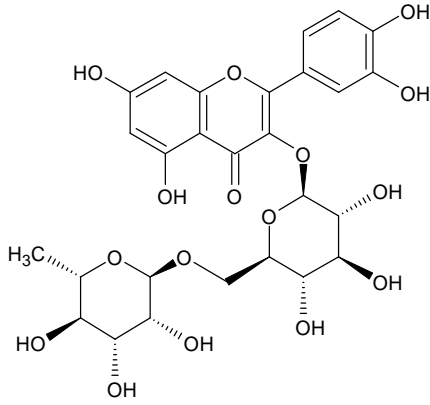
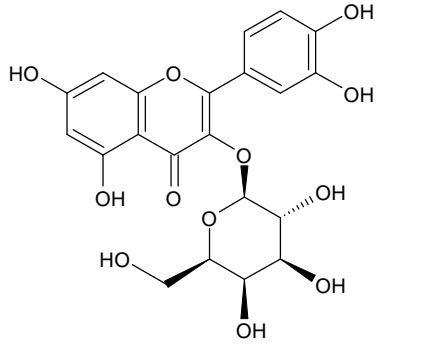
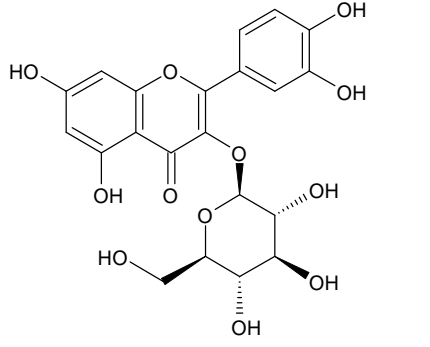
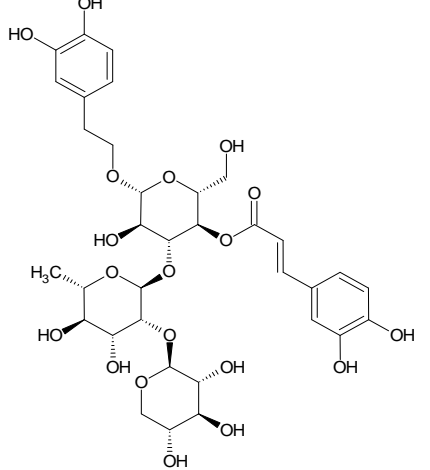
6.2.3.1. Результаты УЭЖХ-МС/МС анализа извлечения с использованием в качестве экстрагента 50%-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в соотношении 2 моль : 1 моль : 1 моль (ГЭР-23)

Предполагаемые биологически активные компоненты, экстрагируемые при помощи ГЭР-23 на основе 50%-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в соотношении 2 моль : 1 моль : 1 моль, приведены в таблице 23.

Таблица 23 - Результаты УЭЖХ-МС/МС анализа БАВ, экстрагируемых с помощью 50%-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в соотношении 2 моль : 1 моль : 1 моль [28, 39, 52].

Название вещества	tR	Длина волны поглощения УФ	Мол. вес	Предполагаемая структура
Хлорогеновая кислота	4.28	326	354	
Кофейная кислота	5.43	325	180	
Кверцетин-3-рамнозид-7-глюкозид	8.09	361	610	

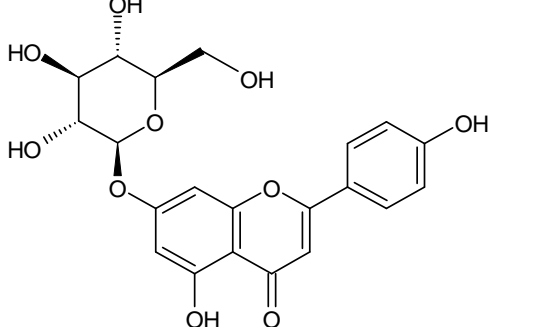
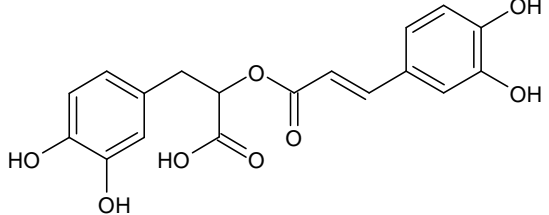
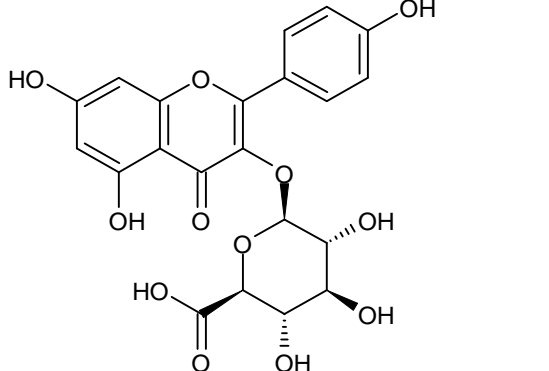
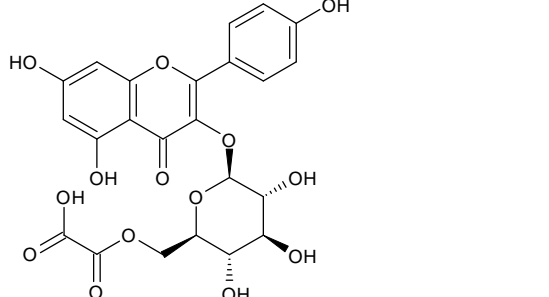
Продолжение таблицы 23

Рутин	8.27	354	610	
Кверцетин-3-галактозид	8.58	351	464	
Кверцетин-3-глюкозид	8.81	352	464	
Лавандулифолиозид	8.9	331	756	

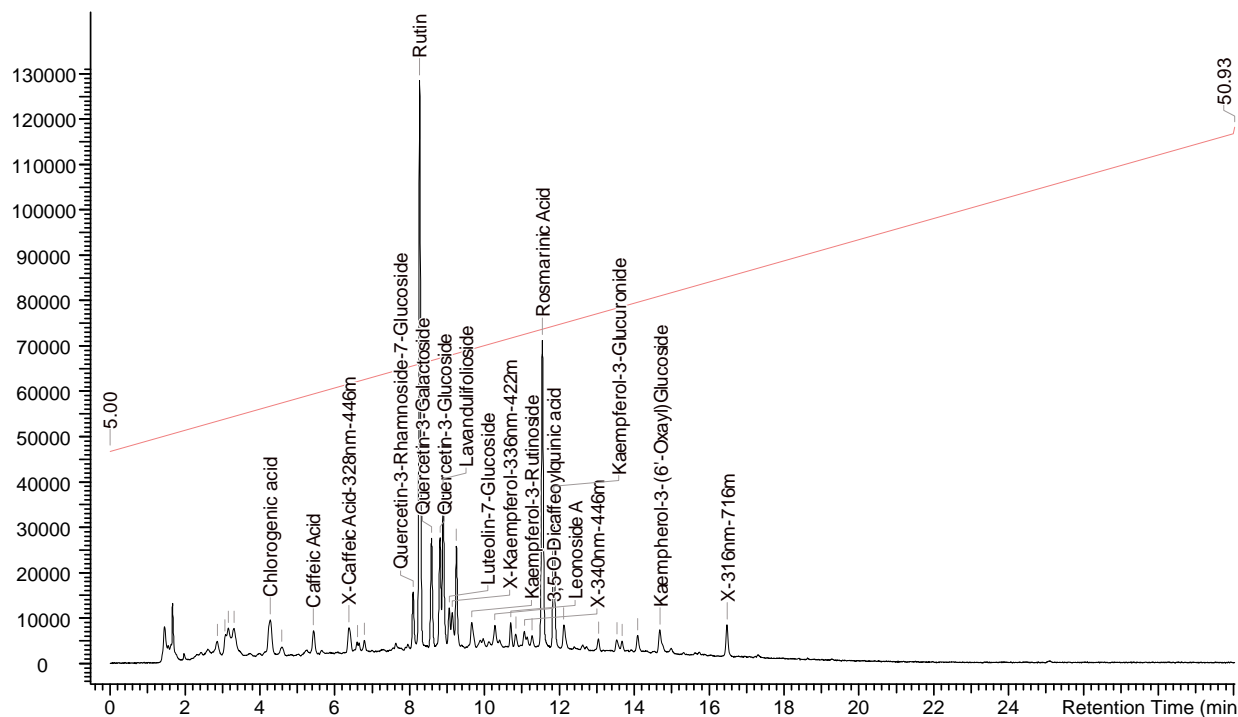
Продолжение таблицы 23

Лютеолин-7- глюкозид	9.06	348	448	
Вербаскозид	9.25	331	624	
Кемпферол-3- рутинозид	9.66	350	594	
3,5-O- Dicaffeoylquinic acid	10.28	327	516	
Леонозид А	10.7	331	770	

Продолжение таблицы 23

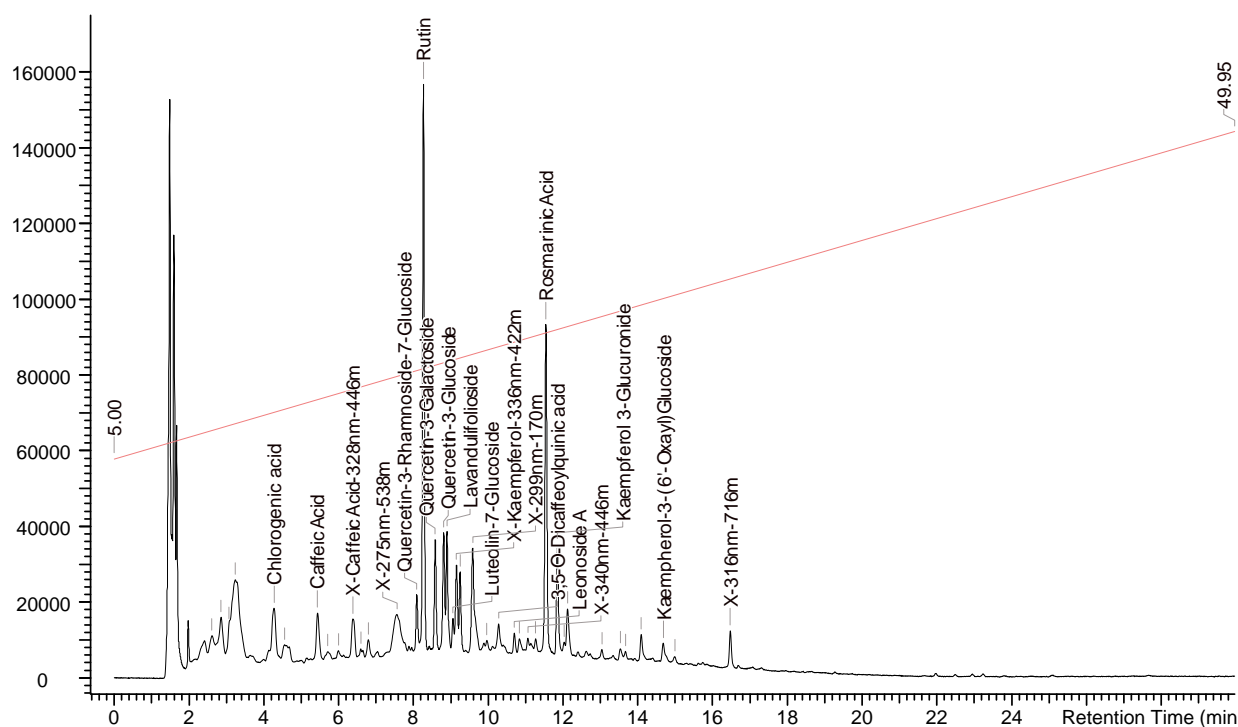
Апигенин-7- глюкозид	10.83	336	432	 <p>The structure shows a flavone core (apigenin) with a glucose molecule attached to the 7-position of the A-ring via an oxygen atom. The glucose is in its cyclic pyranose form with specific stereochemistry indicated by wedged and dashed bonds.</p>
Розмариновая кислота	11.54	330	360	 <p>The structure shows a central pyruvic acid moiety esterified to two caffeoyl units. Each caffeoyl unit consists of a propenoic acid chain attached to a benzene ring with two hydroxyl groups at the 3 and 4 positions.</p>
Кемпферол-3- глюкуронид	11.85	340	462	 <p>The structure shows a flavone core (quercetin) with a glucose molecule attached to the 3-position of the A-ring via an oxygen atom. The glucose is in its cyclic pyranose form with specific stereochemistry indicated by wedged and dashed bonds.</p>
Кемпферол-3-(6'- оксаил)-глюкозид	14.68	341	520	 <p>The structure shows a flavone core (quercetin) with a glucose molecule attached to the 3-position of the A-ring via an oxygen atom. The glucose is in its cyclic pyranose form with specific stereochemistry indicated by wedged and dashed bonds. Additionally, a 6-oxoheptanoate chain is attached to the glucose moiety.</p>

Хроматограммы, полученные при длинах волн 360 нм и 260 нм,
приведены на рисунках 29 и 30.



Name	tR	Peak Area (Y units*ms)	Area Percent (%)	Resolution	Plate Number
Chlorogenic acid	4.28	5.88e+7	3.35	1.83	8451
Caffeic Acid	5.43	2.37e+7	1.35	7.61	33263
X-Caffeic Acid-328nm-446m	6.38	3.01e+7	1.72	1.46	29601
Quercetin-3-Rhamnoside-7-Glucoside	8.09	4.17e+7	2.38	2.07	142212
Rutin	8.27	3.98e+8	22.69	3.66	159885
Quercetin-3-Galactoside	8.58	8.34e+7	4.76	2.49	146701
Quercetin-3-Glucoside	8.81	8.41e+7	4.80	0.95	140994
Lavandulifolioside	8.90	1.15e+8	6.55	1.86	183782
Luteolin-7-Glucoside	9.06	2.99e+7	1.71	0.99	132478
X-Kaempferol-336nm-422m	9.14	3.06e+7	1.75	1.53	330893
Verbascoside	9.25	7.25e+7	4.14	4.32	199987
Kaempferol-3-Rutinoside	9.66	2.84e+7	1.62	4.69	84600
3,5-O-Dicaffeoylquinic acid	10.28	2.66e+7	1.52	4.29	137135
Leonoside A	10.70	1.82e+7	1.04	1.33	225318
Apigenin-7-Glucoside	10.83	1.18e+7	0.67	2.03	159047
X-340nm-446m	11.06	2.35e+7	1.34	1.78	128105
Rosmarinic Acid	11.54	2.48e+8	14.16	3.23	237757
Kaempferol-3-Glucuronide	11.85	1.23e+8	7.00	2.85	249609
X-Caffeic Acid-328nm-440m	12.12	2.64e+7	1.51	7.30	165656
Kaempferol-3-(6'-Oxayl)Glucoside	14.68	2.79e+7	1.59	15.01	221331
X-316nm-716m	16.48	2.93e+7	1.67	-	425971

Рисунок 29 - Хроматограмма при 360 нм.



Name	tR	Peak Area (Y units*ms)	Area Percent (%)	Resolution	Plate Number
Chlorogenic acid	4.27	1.22e+8	4.02	1.44	7758
Caffeic Acid	5.44	8.92e+7	2.93	1.20	21647
X-Caffeic Acid-328nm-446m	6.38	6.65e+7	2.19	1.34	22971
X-275nm-538m	7.56	1.76e+8	5.77	2.22	6090
Quercetin-3-Rhamnoside-7-Glucoside	8.09	5.33e+7	1.75	2.04	132429
Rutin	8.27	4.89e+8	16.08	3.64	156937
Quercetin-3-Galactoside	8.58	9.88e+7	3.25	2.45	149753
Quercetin-3-Glucoside	8.81	1.14e+8	3.74	0.95	134036
Lavandulifolioside	8.90	1.12e+8	3.67	2.46	169343
Luteolin-7-Glucoside	9.06	2.89e+7	0.95	1.26	642126
X-Kaempferol-336nm-422m	9.15	8.92e+7	2.93	1.00	121498
Verbascoside	9.25	7.00e+7	2.30	3.41	184378
X-299nm-170m	9.58	1.53e+8	5.04	3.51	109658
3,5-O-Dicaffeoylquinic acid	10.28	3.51e+7	1.15	4.24	132087
Leonoside A	10.70	1.91e+7	0.63	1.35	208901
Apigenin-7-Glucoside	10.83	1.99e+7	0.65	1.58	92367
X-340nm-446m	11.06	3.11e+7	1.02	0.87	35561
Rosmarinic Acid	11.54	3.32e+8	10.93	3.22	227400
Kaempferol 3-Glucuronide	11.85	1.13e+8	3.70	2.33	239606
X-Caffeic Acid-328nm-440m	12.12	6.13e+7	2.02	6.90	147409
Kaempferol-3-(6'-Oxayl)Glucoside	14.68	3.03e+7	1.00	2.23	223308
X-316nm-716m	16.48	4.06e+7	1.33	-	425616

Рисунок 30 - Хроматограмма при 260 нм.

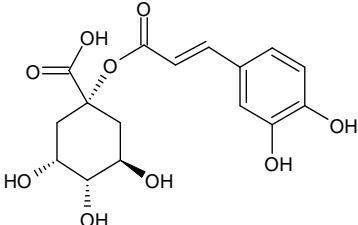
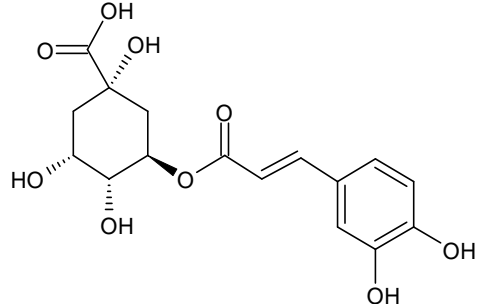
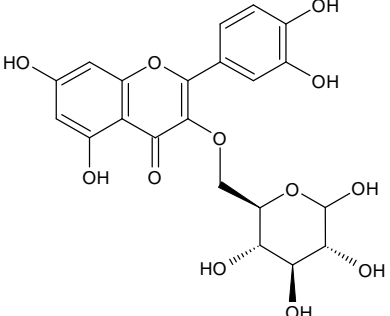
Как можно увидеть, пики с временем удерживания 8.09, 8.27, 8.58 и 8.81 мин имеют одинаковую массу фрагмента при ионизации в позитивном режиме 303 и сходный УФ-спектр с максимум около 354 нм. На основании этого можно предположить, что все они являются гликозидами кверцетина. Доказательством наличия рутина и гиперозида (кверцетин-3-О-галактозида) является совпадение времени удерживания и спектров на полученной хроматограмме с пиками данных веществ в смеси стандартов. Как видно из хроматограммы, комплекс БАВ также содержит кверцетин-3-глюкозид. Также пики с временем удерживания 9.06, 9.66, 11.85 и 14.68 мин имеют одинаковую массу фрагмента при ионизации в позитивном режиме 287 и сходный УФ-спектр с максимум около 346 нм. На основании этого можно предположить, что все они являются гликозидами лютеолина или кемпферола. Для правильного выбора учитывается тот факт, что производные лютеолина имеют близкое время удерживания с аналогичными производными кверцетина, а производные кемпферола существенно более гидрофобные (имеют большее время удерживания). Пики с временем удерживания 4.28, 5.43, 8.9, 9.25, 10.28 и 11.54 мин имеют одинаковую массу фрагмента при ионизации в позитивном режиме 163 и сходный УФ-спектр с максимум около 328 нм. Следовательно, можно заключить, что все они являются производными кофейной кислоты. Доказательством наличия хлорогеновой кислоты является совпадение времени удерживания и спектров пика на хроматограмме с пиком хлорогеновой кислоты в смеси стандартов. Экстрагируемые БАВ также содержат кофейную кислоту и ее производные. Пик с временем удерживания 10.7 мин, длиной волны поглощения 331 нм, массой продукта фрагментации 177 и массой молекулярного иона 769- может быть производным феруловой кислоты и иметь структуру леонозида А по аналогии со структурой лавандулиофолиозида. Для остальных пиков предложить подходящую структуру с учетом предполагаемых в составе БАВ соединений не представляется возможным из-за противоречий с ожидаемым временем удерживания или УФ-спектром.

Хроматограммы всех образцов представлены в Приложении Г.

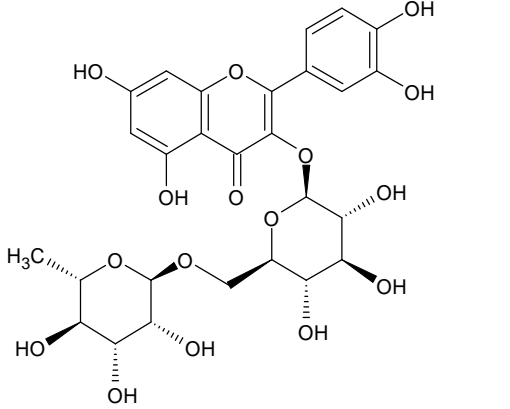
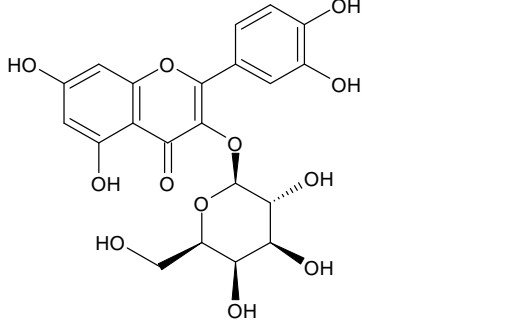
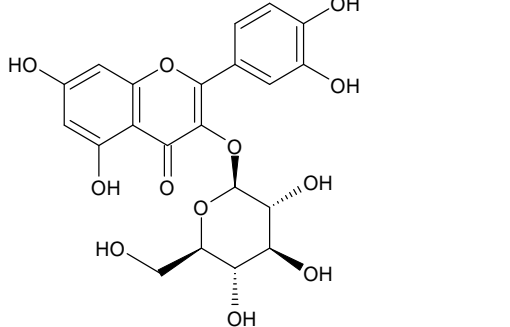
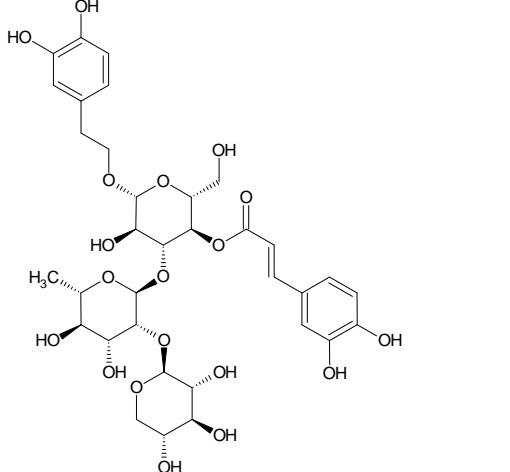
6.2.3.2. Результаты УЭЖХ-МС/МС анализа извлечения с использованием в качестве экстрагента 70 %-ого этилового спирта

Предполагаемые биологически активные компоненты, экстрагируемые из модельной растительной композиции при помощи 70 %-ого этилового спирта, приведены в таблице 24.

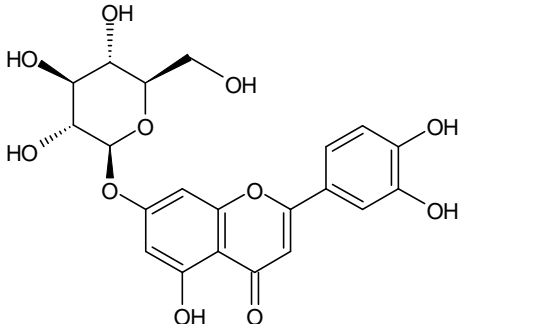
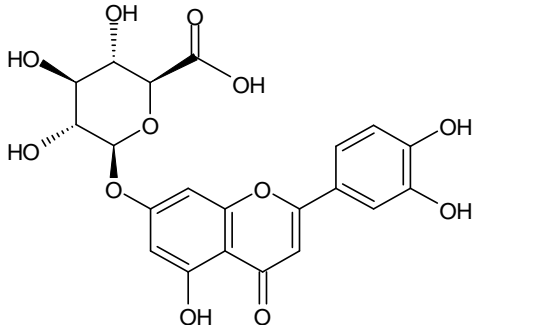
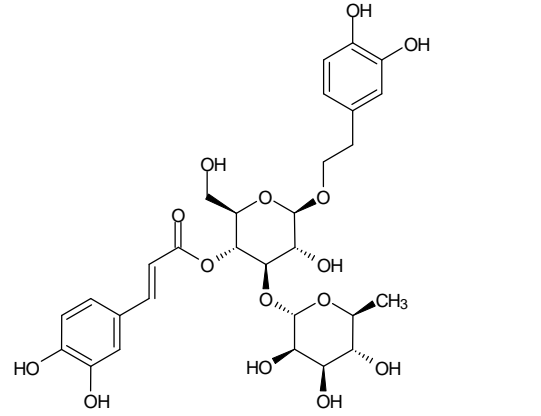
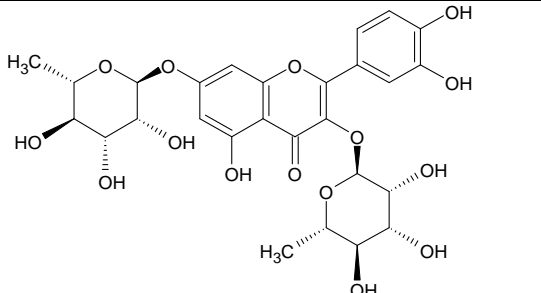
Таблица 24 - Результаты УЭЖХ-МС/МС анализа БАВ, экстрагируемых с помощью 70%-ого этилового спирта [28, 39, 52].

Название вещества	tR	Длина волны поглощения УФ	Мол. вес	Предполагаемая структура
1-кофеилхиновая кислота	3.31	297	354	
Хлорогеновая кислота	4.5	326	354	
Изокверцетин	7.63	344	464	

Продолжение таблицы 24

Название вещества	tR	Длина волны поглощения УФ	Мол. вес	Предполагаемая структура
Рутин	8.63	354	610	
Гиперозид	8.93	354	464	
Кверцетин-3-гликозид	9.16	354	464	
Лавандулиофолиозид	9.27	332	756	

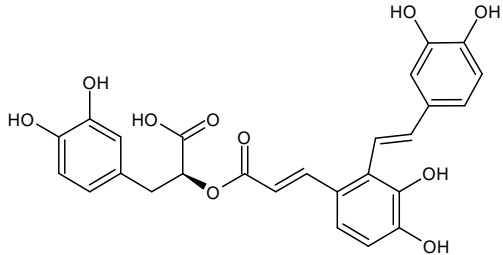
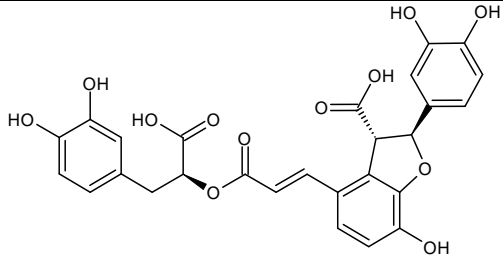
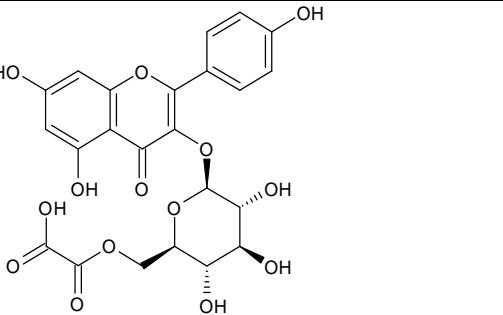
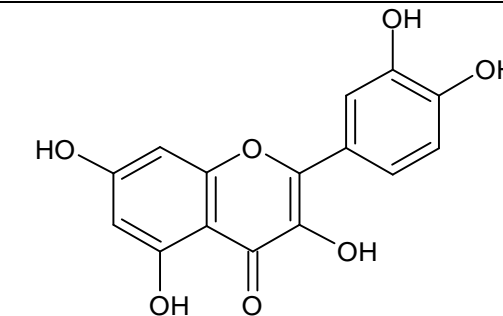
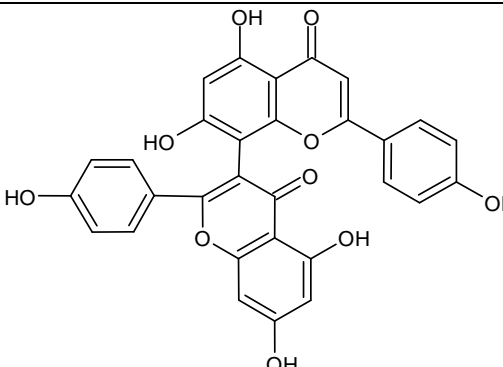
Продолжение таблицы 24

Название вещества	tR	Длина волны поглощения УФ	Мол. вес	Предполагаемая структура
Лютеолин-7- глюкозид	9.42	352	448	
Лютеолин-7- глюкуронид	9.49	350	462	
Вербаскозид	9.63	329	624	
Кверцетин-3,7- дирамнозид	10.04	363	594	

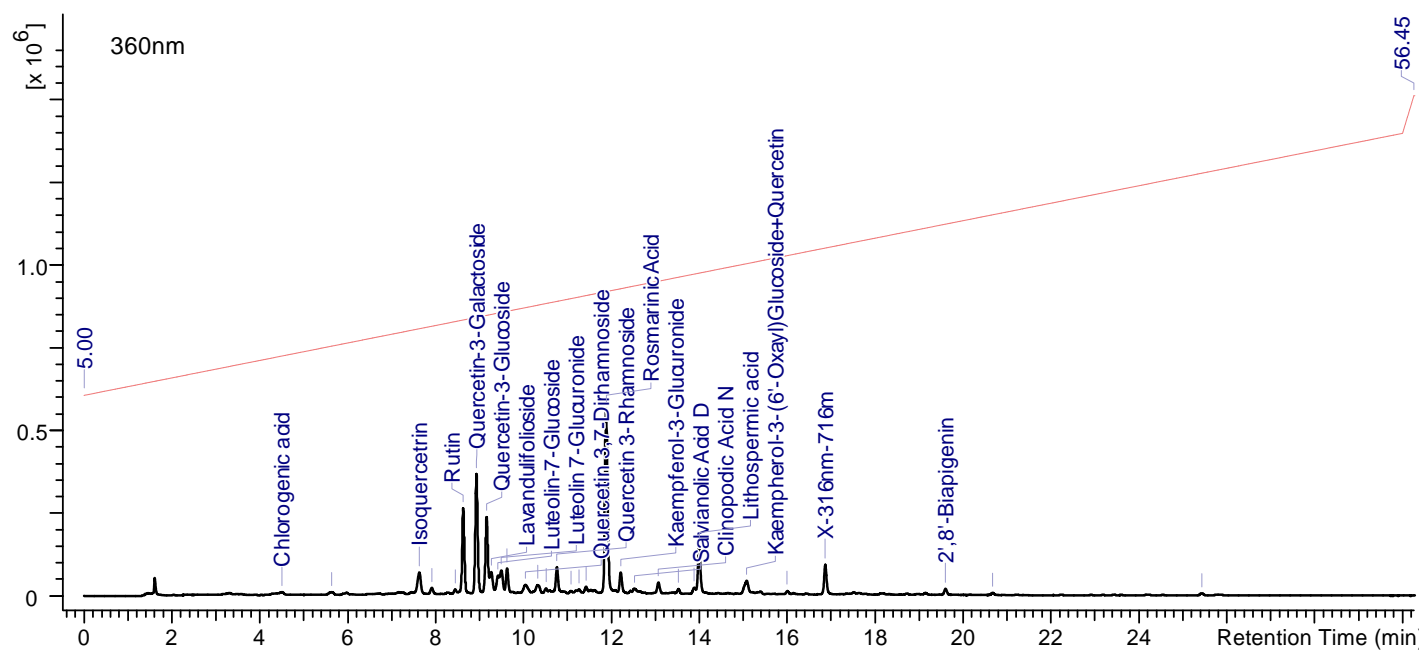
Продолжение таблицы 24

Название вещества	tR	Длина волны поглощения УФ	Мол. вес	Предполагаемая структура
Кверцетин-3-ксилозид	10.32	350	434	
Кверцетин-3-рамнозид	10.76	351	448	
Розмариновая кислота	11.88	329	360	
Кемпферол-3-глюкуронид	12.21	340	462	
Сальвианоловая кислота D	12.52	329	418	

Продолжение таблицы 24

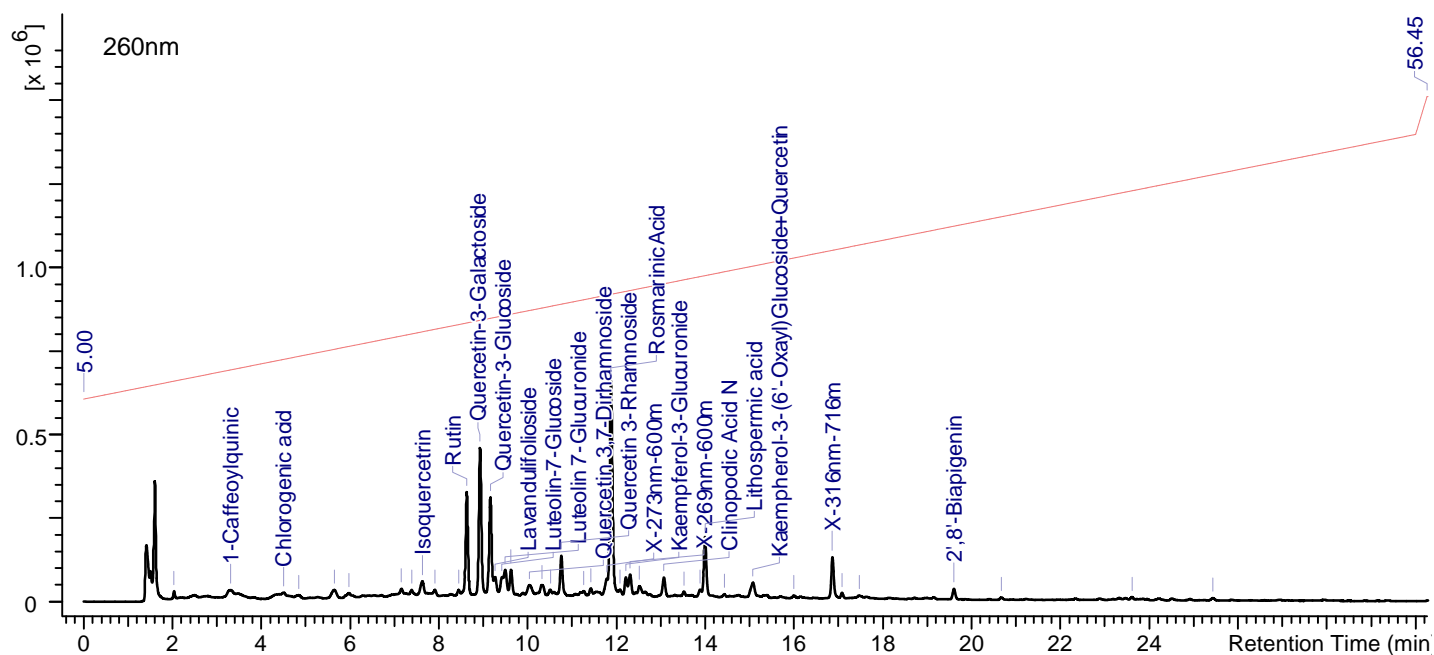
Название вещества	tR	Длина волны поглощения УФ	Мол. вес	Предполагаемая структура
Клиноподиевая кислота N	13.07	325	538	
Литоспермическая кислота	13.99	328	538	
Кемпферол-3-(6'-оксаил)-глюкозид	15.07	339	520	
Кверцетин	15.07	369	302	
Биапигенин	19.6	331	538	

Хроматограммы, полученные при длинах волн 360 нм и 260 нм, приведены на рисунках 31 и 32.



Name	tR	Peak Area (Y units*ms)	Area Percent	Resolution	Plate Number	USP Symmetry Factor	USP S/N
Chlorogenic acid	4.50	1.0768e+8	1.051	5.554	1646.440	0.665	8.786
Isoquercetrin	7.63	3.9814e+8	3.884	2.413	45441.309	0.696	48.289
Rutin	8.63	9.4974e+8	9.266	3.159	136259.484	1.028	190.320
Quercetin-3-Galactoside	8.93	1.3813e+9	13.476	2.240	129181.844	1.092	266.350
Quercetin-3-Glucoside	9.16	9.3075e+8	9.080	1.262	122642.891	-	169.461
Lavandulifolioside	9.26	2.8466e+8	2.777	2.493	359466.125	-	46.212
Luteolin-7-Glucoside	9.42	2.0971e+8	2.046	1.266	370714.625	-	38.205
Luteolin 7-Glucuronide	9.50	3.0990e+8	3.023	1.702	410851.750	-	49.259
Verbascoside	9.63	2.6032e+8	2.540	3.329	166102.219	-	53.443
Quercetin 3,7-Dirhamnoside	10.04	1.7969e+8	1.753	1.540	44758.480	-	18.048
Quercetin 3-Xyloside	10.32	1.5337e+8	1.496	1.265	60984.957	-	17.250
Quercetin 3-Rhamnoside	10.76	2.7859e+8	2.718	3.389	214121.922	1.003	55.850
Rosmarinic Acid	11.88	2.3576e+9	23.001	3.140	185992.594	1.138	605.230
Kaempferol-3-Glucuronide	12.21	2.2533e+8	2.198	2.824	248021.219	1.215	65.108
Salvianolic Acid D	12.52	1.3783e+8	1.345	3.580	100094.820	1.503	15.609
Clinopodic Acid N	13.07	1.4115e+8	1.377	4.470	232466.703	0.845	35.906
Lithospermic acid	13.99	6.1592e+8	6.009	6.641	281401.813	-	158.200
Kaempferol-3-(6'-Oxayl)Glucoside +Quercetin	15.08	2.5337e+8	2.472	7.582	118400.375	1.176	41.990
X-316nm-716m	16.87	3.5160e+8	3.430	25.632	467516.188	1.123	96.736
2',8'-Biapigenin	19.60	8.0163e+7	0.782	9.673	497870.438	1.099	55.737

Рисунок 31 - Хроматограмма при 360 нм.



Name	tR	Peak Area (Y units*ms)	Area Percent	Resolution	Plate Number	USP Symmetry Factor	USP S/N
1-Caffeoylquinic	3.31	4.4502e+8	3.084	1.555	694.576	2.180	15.126
Chlorogenic acid	4.50	3.5179e+8	2.438	1.273	1223.010	-	11.843
Isoquercetrin	7.63	2.7736e+8	1.922	2.176	42832.625	-	31.966
Rutin	8.63	1.1532e+9	7.991	3.129	133807.047	0.981	231.240
Quercetin-3-Galactoside	8.93	1.7154e+9	11.887	2.230	128388.711	1.087	330.465
Quercetin-3-Glucoside	9.16	1.2108e+9	8.390	1.285	121017.453	-	219.577
Lavandulifolioside	9.27	2.3607e+8	1.636	2.446	357417.188	-	40.349
Luteolin-7-Glucoside	9.42	2.0592e+8	1.427	1.144	338727.875	-	40.480
Luteolin 7-Glucuronide	9.49	3.7676e+8	2.611	1.596	357682.000	-	57.237
Verbascoside	9.63	3.2441e+8	2.248	3.105	140814.609	-	57.807
Quercetin 3,7-Dirhamnoside	10.04	2.6087e+8	1.808	1.528	42382.746	-	23.505
Quercetin 3-Xyloside	10.32	2.3023e+8	1.595	1.222	59085.707	-	23.757
Quercetin 3-Rhamnoside	10.76	4.8363e+8	3.351	2.394	197951.844	1.070	89.939
X-273nm-600m	11.78	1.7965e+8	1.245	1.054	437353.656	-	43.681
Rosmarinic Acid	11.88	2.8362e+9	19.654	2.388	179081.797	-	481.292
Kaempferol-3-Glucuronide	12.21	1.9180e+8	1.329	0.747	194435.359	-	39.442
X-269nm-600m	12.31	2.5607e+8	1.774	1.941	175321.969	-	46.007
Salvianolic Acid D	12.52	1.9774e+8	1.370	3.881	123383.219	-	23.951
Clinopodic Acid N	12.52	2.6117e+8	1.810	4.344	219601.516	0.804	52.104
Lithospermic acid	13.99	7.4659e+8	5.174	4.194	287714.781	-	163.518
Kaempferol-3-(6'-Oxayl)Glucoside +Quercetin	15.07	2.6634e+8	1.846	7.481	130005.953	1.135	38.742
X-316nm-716m	16.87	4.9975e+8	3.463	2.168	460934.094	1.194	139.834
2',8'-Biapigenin	19.60	1.3234e+8	0.917	10.090	513330.406	1.070	20.403

Рисунок 32 - Хроматограмма при 260 нм.

Пики с временем удерживания 7.63, 8.63, 8.93, 9.16, 10.04, 10.32 и 10.76 мин имеют одинаковую массу фрагмента при ионизации в позитивном режиме 303 и сходный УФ-спектр с максимумом около 354 нм. На основании этого можно предположить, что все они являются гликозидами кверцетина. По совпадению времени удерживания и спектров пиков на полученной хроматограмме с пиками рутина и гиперозида в смеси стандартов сделан вывод об их присутствии в смеси БАВ. Пики с временем удерживания 9.42, 9.50, 12.21 и 15.08 мин имеют одинаковую массу фрагмента при ионизации в позитивном режиме 287 и сходный УФ-спектр с максимумом около 346 нм. На основании этого можно предположить, что все они являются гликозидами лютеолина или кемпферола. Для правильного выбора учитывается тот факт, что производные лютеолина имеют близкое время удерживания с аналогичными производными кверцетина, а производные кемпферола существенно более гидрофобные (имеют большее время удерживания). Пики с временем удерживания 3.31, 4.5, 9.26, 9.63, 11.88 и 12.52 мин имеют одинаковую массу фрагмента при ионизации в позитивном режиме 163 и сходный УФ-спектр с максимумом около 328 нм. Следовательно, можно заключить, что все они являются производными кофейной кислоты. Доказательством наличия хлорогеновой кислоты в экстрагируемых БАВ является совпадение времени удерживания и спектров пика на хроматограмме с пиком хлорогеновой кислоты в смеси стандартов. Два пика с временем удерживания 13.07 и 13.99 мин, длиной волны поглощения 327 нм, массой продукта фрагментации 323 и массой молекулярного иона 537 могут относиться к изомерам литоспермиевой кислоты. Пик с временем удерживания 19.6 мин, длиной волны поглощения 331 нм, массой продукта фрагментации 323 и массой молекулярного иона 537 может относиться к апигенину. Для остальных пиков предложить подходящую структуру с учетом предполагаемых в составе экстрагируемых БАВ соединений не представляется возможным из-за противоречий с ожидаемым временем удерживания или УФ-спектром.

Хроматограммы всех образцов представлены в Приложении Д.

6.2.3.3. 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

В таблице 25 представлен расчет относительного содержания для веществ, экстрагируемых с помощью двух сравниваемых экстрагентов:

Таблица 25 – 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, 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 (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%

Можно сделать вывод, что каждый экстрагент имеет преимущество по экстракции половины из совпадающих компонентов. Однако число экстрагируемых этиловым спиртом компонентов больше. Выбор типа экстрагента должен определяться задачами исследований по проведению направленной экстракции БАВ.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6

1. С помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (УЭЖХ-МС/МС) установлен состав БАВ, извлекаемых из экспериментальной растительной композиции с использованием в качестве экстрагента 1) 50 %-ого водного раствора ГЭР на основе холина хлорида, глюкозы и воды в мольном соотношении 2:1:1 и 2) 70 %-ого этилового спирта. Продемонстрирован обширный спектр полифенольных соединений, экстрагированных из модельной растительной композиции. Установлена структура таких БАВ, как гликозиды кверцетина, рутин, гиперозид, хлорогеновая кислота, кофейная кислота и ее производные.
2. Проведен сравнительный анализ экстрагирующей способности изучаемых экстрагентов для различных биологически активных веществ, содержащихся в модельной растительной композиции. Показано, что каждый экстрагент имеет преимущество по экстракции половины из совпадающих компонентов, однако общее число экстрагируемых этиловым спиртом компонентов больше. 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.

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 дальнейшее изучение токсикологического профиля полученного извлечения и глубоких эвтектических растворителей, поиск методов удаления экстрагента и устранения токсичности, исследование свойств и характеристик глубоких эвтектических растворителей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Асанов, Э.Б. Разработка способа получения и стандартизации экстракта шалфея масляного: Автореф. дис. ... к.ф.н.: 15.00.02 / Э.Б. Асанов // Москва, 1997. – 19 с.
2. Бабаджанян, А.А. Применение фотометрических методов в анализе растительных лекарственных средств / А.А. Бабаджанян, Н.Ш. Кайшева, И.В. Умняхина // Беликовские чтения: материалы IV Всероссийской научно-практической конференции. - 2015. - С. 17–18.
3. Беликов, В.Г. Применение математического планирования и обработка результатов эксперимента в фармации /В.Г. Беликов, В.Д. Пономарев, Н.И. Коковкин-Щербак. — М.: Медицина, 1973. 231 с.
4. Бобылев Р.В., Грядунова Г.П., Иванова Л.А. Технология лекарственных форм: Учебник в 2-х томах / Под ред. Ивановой Л.А.- М.: Медицина, 1991. - 544 с.
5. Бойко, С.А. Взаимодействие фитопрепаратов, содержащих экстракт зверобоя, с лекарственными средствами /С.А. Бойко, А.А. Сущенко, Е.А. Пятых // Международный студенческий научный вестник. – 2015. – № 2-1.
6. Государственная Фармакопея РФ, XIII издание, ФС.2.5.0015.15.
7. Государственная Фармакопея РФ, XIII издание, ФС.2.5.0034.15.
8. Государственная Фармакопея РФ, XIII издание, ФС.2.5.0047.15.
9. Государственная Фармакопея РФ, XIV издание, ФС.2.5.0084.18.
10. Джавахян, М. А. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Ковалева, Е.Л. Современные требования к контролю качества лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов по показателю «Измельченность» / Е.Л. Ковалева, В.В. Шелестова, Л.Н. Фролова, О.В. Бондаренко, О.Б. Николаева, В.Ю. Кутейников // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. - 2020. - Т. 10, N 4. - С. 218–227.
14. Леонова, М.В. Экстракционные методы изготовления лекарственных средств из растительного сырья: учебно-методическое пособие / М.В. Леонова, Ю.Н. Климочкин. – Самара: Самар. гос. техн. ун-т., 2012. – 111 с.
15. Мардарьева, К.Р. Макроскопический и микроскопический анализ сбора «стоп-урат» / К.Р. Мардарьева, Т.П. Овсянникова // Природные соединения и здоровье человека: сборник научных статей Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием, Иркутск, 03–04 декабря 2020 года. – Иркутск: Иркутский государственный медицинский университет. - 2020. - С. 97-103.
16. Мартынов, А. М. Микроморфологические признаки сбора грудного "Бронхолисан" / А.М. Мартынов, Т.Д. Даргаева // Международный научно-исследовательский журнал. - 2021. -Т. 1-3, N 103. - С.73-78.
17. Минина, С.А. Химия и технология фитопрепаратов / С.А. Минина, И.Е. Каухова // Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2004 – С.76–93,97–103,122–125,205– 220.
18. Негробов, В.В. Растительная клетка: учебное пособие / В.В. Негробов // Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2010. – 171 с.
19. Пономарев, В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья / В.Д. Пономарев // Москва: Медицина, 1976. – С. 10 – 22,30–61,65–72,110–125.

20. 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.
21. Токарева, М.Г. Разработка состава и технологии лекарственных средств на основе растительной композиции седативного действия: дис. ... канд. фарм. наук: 14.04.01/ М. Г. Токарева. – Пятигорск, 2022. – 168 с.
22. Ушкалова, А.В. Эффективность и безопасность антидепрессивных и седативных средств растительного происхождения / А.В. Ушкалова, Т.С. Илларионова // Фарматека. - 2007. - Т.20, № 154. - С. 10–14.
23. Abbott, A.P. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures / A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah // Chem. Commun. - 2003. - P. 70-71.
24. Abbott, A.P. Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains / A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, H.L. Munro, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah // Chem. Commun. - 2001. - P. 2010-2011.
25. Abbott, A.P. Thermodynamics of phase transfer for polar molecules from alkanes to deep eutectic solvents / A.P. Abbott et al. // Fluid Phase Equilibria. - 2017. - Vol. 448. - P. 99–104.
26. Ahmadi, R. Assessment of cytotoxicity of choline chloride-based natural deep eutectic solvents against human HEK-293 cells: A QSAR analysis / R. Ahmadi, B. Hemmateenejad, A. Safavi, Z. Shojaeifard, M. Mohabbati, O. Firuzi // Chemosphere. - 2018. Vol. 209. P. 831–838
27. Alcalde, R. On the properties of (choline chloride + lactic acid) deep eutectic solvent with methanol mixtures / R. Alcalde, M. Atilhan, S. Aparicio // J. Mol. Liq. - 2018. - Vol. 272. - P. 815–820.
28. Angeloni, S. Phytochemical Profile and Biological Activities of Crude and Purified *Leonurus cardiaca* Extracts / S. Angeloni, E. Spinozzi, F. Maggi, G. Sagratini, G. Caprioli, G. Borsetta, G. Ak, K.I. Sinan, G. Zengin, S. Arpini, G. Mombelli, M. Ricciutelli // Plants (Basel). - 2021. - Vol. 10, N 2. - P. 195.

29. Bajkacz, S. Development of a method based on Natural Deep Eutectic Solvents for extraction of flavonoids from food samples / S. Bajkacz, J. Adamek // *Food Analytical Methods*. - 2018. - Vol.11, N 5. - P. 1330–1344.
30. Belebna, M. Toxicity of natural deep eutectic solvent betaine: glycerol in rats / M. Belebna, M. Ruesgas-Ramón, B. Bonafos, G. Fouret, F. Casas, C. Coudray, E. Durand, M. Cruz Figueroa-Espinoza, C. Feillet-Coudray // *J. Agric. Food Chem.* - 2018. - Vol. 66. - P. 6205–6212.
31. Brockmöller J. Hypericin and pseudohypericin: Pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans / J. Brockmöller // *Pharmacopsychiatry*. - 1997. - Vol.30. - P. 94-101.
32. Chen, J. The effect of deep eutectic solvent on the pharmacokinetics of salvianolic acid B in rats and its acute toxicity test / J. Chen, Q. Wang, M. Liu, L. Zhang // *J. Chromatogr. B*. - 2017. - Vol. 1063. - P. 60–66.
33. Choi, Y.H. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? / Y.H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dai, M. Verberne, F. Hollmann, I.W.C.E. Arends et al. // *Plant Physiol*. - 2011. - Vol. 156. - P. 1701-1705.
34. Cui, Q. Deep eutectic solvent-based microwave-assisted extraction of genistin, genistein and apigenin from pigeon pea roots / Q. Cui, X. Peng, X.-H. Yao, Z.-F. Wei, M. Luo, W. Wang, C.-J. Zhao, Y.-J. Fu, Y.-G Zu // *Sep. Purif. Technol.* - 2015. - Vol. 150. - P. 63–72.
35. Dai, Y. Application of Natural Deep Eutectic Solvents in the Extraction of Quercetin from Vegetables / Y. Dai, K.H. Row // *Molecules*. - 2019. - Vol.24, N 12. - P. 2300–2311.
36. Dai, Y. Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: mixtures of solids as extraction solvents / Y. Dai, J. Van Spronsen, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi // *J. Nat. Prod.* - 2013. - Vol. 76. - P. 2162-2173.
37. Dai, Y. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology / Y. Dai, J. van Spronsen, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi // *Anal. Chim. Acta*. - 2013. - Vol. 766. - P. 61-68.

38. Dai, Y. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications / Y. Dai, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi // *Food Chem.* - 2015. - Vol.185. - P. 14-19.
39. Dall'Acqua, S. Hypericum triquetrifolium and H. neurocalycinum as Sources of Antioxidants and Multi-Target Bioactive Compounds: A Comprehensive Characterization Combining In Vitro Bioassays and Integrated NMR and LC-MS Characterization by Using a Multivariate Approach / S. Dall'Acqua, G. Ak, K.I. Sinan, F. Elbasan, I. Ferrarese, S. Sut, E. Yildiztugay, G. Peron, E. Schievano, M.C. Nancy Picot-Allain, M.F. Mahomoodally, G. Zengin // *Front Pharmacol.* - 2021. - Vol. 26, N 12. - P. 660735.
40. Durand, E. Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions / E. Durand, J. Lecomte, B. Barea, G. Piombo, E. Dubreucq, P. Villeneuve // *Process Biochem.* - 2012. - Vol. 47. - P. 2081-2089.
41. Durand, E. From green chemistry to nature: The versatile role of low transition temperature mixtures / E. Durand, J. Lecomte, P. Villeneuve // *Biochimie.* - 2016. - Vol. 120. - P. 119–123.
42. Florindo, C. Development of hydrophobic deep eutectic solvents for extraction of pesticides from aqueous environments / C. Florindo, L. Branco, I. Marrucho // *Fluid Phase Equilib.* - 2017. - Vol. 448. - P. 135–142.
43. Florindo, C. From phase change materials to green solvents: Hydrophobic low viscous fatty acid-based deep eutectic solvents / C. Florindo, L. Romero, I. Rintoul, L.C. Branco, I.M. Marrucho // *ACS Sustain. Chem. Eng.* - 2018. - Vol. 6. - P. 3888–3895
44. Fu, Q. Paeonenoides D and E: two new nortriterpenoids from *Paeonia lactiflora* and their inhibitory activities on NO production / Q. Fu, L. Qiu, H.M. Yuan et al. // *Helvetica Chimica Acta.* - 2016. - Vol.99. - P. 46-49.
45. Gorke, J.T. Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents / J.T. Gorke, F. Srienc, R.J. Kazlauskas // *Chem. Commun.* - 2008. - P. 1235-1237.
46. Gutierrez, M.C. Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures / M.C.

- Gutierrez, M.L. Ferrer, C.R. Mateo, F. Del Monte // *Langmuir*. - 2009. - Vol. 25. - P. 5509-5515.
47. Hayyan, M. Are deep eutectic solvents benign or toxic? / M. Hayyan, M.A. Hashim, A. Hayyan, M.A. Al-Saadi, I.M. AlNashef, M.E.S. Mirghani, et al. // *Chemosphere*/ - 2013. - Vol. 90, P. 2193-2195.
48. Hayyan, M. Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents / M. Hayyan, M.A. Hashim, M.A. Al-Saadi, A. Hayyan, I.M. AlNashef, M.E.S. Mirghani // *Chemosphere*. - 2011. - Vol. 93. - P. 455-459.
49. Hayyan, M. In vitro and in vivo toxicity profiling of ammonium-based deep eutectic solvents / M. Hayyan, C.Y. Looi, A. Hayyan, W.F. Wong, M.A. Hashim // *PLoS ONE*. - 2015. - Vol.10, N 2.
50. Huang, Y. Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents / Y. Huang et al. // *Food Chemistry*. - 2017. - Vol. 221 . - P. 1400–1405.
51. Huang, Z.L. Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers / Z.L. Huang, B.P. Wu, Q. Wen, T.X. Yang, Z. Yang // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* - 2014. - Vol.89. -P. 1975-1981.
52. Irakli, M. LC-MS Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Solid Residues from the Essential Oil Industry / M. Irakli, A. Skendi, E. Bouloumpasi, P. Chatzopoulou, C.G. Biliaderis // *Antioxidants (Basel)*. - 2021. - Vol. 10, N 12.
53. Jung, D. Toxicometabolomics study of a deep eutectic solvent comprising choline chloride and urea suggests in vivo toxicity involving oxidative stress and ammonia stress / D. Jung, J. Jung, S. Kang, K. Li, I. Hwang, J.H. Jeong, H.S. Kim, J. Lee // *Green Chem.* – 2021. – Vol.23. – P. 1300-1311.
54. Kanberoglu, G.S. Application of Deep Eutectic Solvent in ultrasound-assisted emulsification microextraction of quercetin from some fruits and vegetables / G.S. Kanberoglu, E. Yilmaz, M. Soylak // *J. Mol. Liq.* - 2019. - Vol.279. - P. 571–577.

- 55.Lindberg, D. Deep eutectic solvents (DESs) are viable cosolvents for enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis / D. Lindberg, M. de la Fuente Revenga, M. Widersten // *J. Biotechnol.* - 2020. - Vol. 147. - P. 169-171.
- 56.Liu, Y. Countercurrent assisted quantitative recovery of metabolites from plant-associated natural deep eutectic solvents / Y. Liu, J. Garzon, J.B. Friesen, Y. Zhang, J.B. McAlpine, D.C. Lankin, S.-N. Chen, G.F. Pauli // *Fitoterapia.* - 2016. - Vol. 112. - P. 30–37.
- 57.Liu, Y. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives / Y. Liu, J.B. Friesen, J.B. McAlpine, D.C. Lankin, S.N. Chen, G.F. Pauli // *J Nat Prod.* - 2018. - Vol. 81, N 3. - P. 679-690.
- 58.Macário, I.P.E. Cytotoxicity profiling of deep eutectic solvents to human skin cells / I.P.E. Macário, H. Oliveira, A.C. Menezes, S.P.M. Ventura, J.L. Pereira, A.M.M. Gonçalves, J.A.P. Coutinho, F.J.M Gonçalves // *Sci. Rep.* - 2019. - Vol. 9. - P. 3932.
- 59.Maugeri, Z. Chymotrypsin-catalyzed peptide synthesis in deep eutectic solvents / Z. Maugeri, W. Leitner, P. Domínguez De María // *Eur. J. Org. Chem.* - 2013. -P. 4223-4228.
- 60.Mbous, Y.P. Natural deep eutectic solvents: Cytotoxic profile / Y.P. Mbous, M. Hayyan, W.F. Wong, C.Y. Looi, A. Hayyan, Z. Salleh, O. Mohd-Ali // *SpringerPlus.* - 2016. - Vol. 5, N 1. - P. 913 - 925.
- 61.Mbous, Y.P. Unraveling the cytotoxicity and metabolic pathways of binary natural deep eutectic solvent systems / Y.P. Mbous, M. Hayyan, W.F. Wong, C.Y. Looi, M.A. Hashim // *Sci.Rep.* - 2017. - Vol. 7. - P. 41257.
- 62.Meng, Z. Green and efficient extraction of four bioactive flavonoids from *Pollen Typhae* by ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction / Z. Meng, J. Zhao, H. Duan, H. Guan, L. Zhao // *J. Pharm. Biomed. Anal.* - 2018. - Vol. 161. - P. 246–253.
- 63.Modica-Napolitano, J.S. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells / J.S. Modica-Napolitano, J.R. Aprille // *Adv. Drug Delivery Rev.* - 2001. - Vol. 49. - P. 63-70.

64. Monhemi, H. How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: insights from molecular dynamics simulation of *Candida antarctica* lipase B in urea : choline chloride deep eutectic solvent / H. Monhemi, M.R. Housaindokht, A.A. Moosavi-Movahedi, M.R. Bozorgmehr // *Phys. Chem.* - 2014. - Vol.16. - P. 14882-14893.
65. Mulia, K. Extraction of vitexin from binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) leaves using betaine -1,4 butanediol natural deep eutectic solvent (NADES) / K. Mulia, F. Muhammad, E. Krisanti // *AIP Conf. Proc.* - 2017. - Vol. 1823.
66. Natural deep eutectic solvents as alternative flavonoid extractants from the sedative plant composition / Y. E. Prozhogina, M. A. Dzhavakhyan // *От биохимии растений к биохимии человека : международная научная конференция, Москва, 16–17 июня 2022 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", 2022. – С. 289-295.*
67. Paiva, A. Natural deep eutectic solvents-solvents for the 21st century / A. Paiva, R. Craveiro, I. Aroso, M. Martins, R.L. Reis, A.R.C. Duarte // *ACS Sustain. Chem. Eng.* - 2014. - Vol. 2. - P. 1063–1071.
68. Peng, F. The effect of deep eutectic solvents on the asymmetric hydrolysis of styrene oxide by mung bean epoxide hydrolases / F. Peng et al. // *Bioresources and Bioprocessing.* - 2018. - Vol.5, N 1. - P. 5.
69. Pozharitskaya, O.N. Efficacy of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction of Hydrophilic and Lipophilic Compounds from *Fucus vesiculosus* / O.N. Pozharitskaya, E.D. Obluchinskaya, L.V. Zakharova, A.V. Daurtseva, E.V. Flisyuk, A.N. Shikov // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26. -P. 4198.
70. Radošević, K. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents / K. Radošević, I. Čanak, M. Panic, K. Markov, M. CvjetkoBubalo, J. Frece, V. GaurinaSrcček, I. Radojčić, I.R. Redovniković // *Environ. Sci. Pollut. Res.* - 2018. - Vol. 25. - P. 14188–14196.
71. Radošević, K. Comparative in vitro study of cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents toward fish cell line / K. Radošević, J. Zeleznjak, M. Cvjetko

- Bubalo, I. Radojčić, I.R. Redovniković, I. Slivac, V. GaurinaSrcček // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. - 2016. - Vol. 131. - P. 30–36.
72. Radošević, K. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents / K. Radošević, M.C. Bubalo, V.G. Srcček, D. Grgas, T.L. Dragičević, I.R. Redovniković // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* - 2015. - Vol. 112. - P. 46–53.
73. Ribeiro, B.D. Menthol-based eutectic mixtures: Hydrophobic low viscosity solvents / B.D. Ribeiro, C. Florindo, L.C. Iff, M.A. Coelho, I.M. Marrucho // *ACS Sustain. Chem. Eng.* - 2015. - Vol. 3. - P. 2469–2477.
74. Ruesgas-Ramón, M. Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: Overview, challenges, and opportunities / M. Ruesgas-Ramón, M.C. Figueroa-Espinoza, E. Durand // *J. Agric. Food Chem.* - 2017. - Vol. 65. - P. 3591–3601.
75. Shang, X. Environmentally-friendly extraction of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja leaves with deep eutectic solvents and evaluation of their antioxidant activities / X. Shang et al. // *Molecules*. - 2018. - Vol.23, N 9. - P. 2110-2123.
76. Skarpalezos, D. Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Valuable Flavonoids from Natural Sources / D. Skarpalezos, A. Detsi // *Appl. Sci.* - 2019. - Vol. 9. - P. 4169
77. Sut, S. Natural deep eutectic solvents (NADES) as a tool for bioavailability improvement: Pharmacokinetics of rutin dissolved in proline/glycine after oral administration in rats: Possible application in nutraceuticals / S. Sut, M. Faggian, B. Perissutti, V. Baldan, I. Grabnar, S. Dall'Acqua // *Molecules*. - 2016. - Vol. 21, N 11. - P. 1531 - 1542.
78. Sut, S. Natural deep eutectic solvents (NADES) to enhance berberine absorption: An in vivo pharmacokinetic study / S. Sut, M. Faggian, V. Baldan, G. Poloniato, I. Castagliuolo, I. Grabnar, B. Perissutti, P. Brun, F. Maggi, D. Voinovich // *Molecules*. - 2017. - Vol. 22, N 11. - P. 1921 - 1932.

79. Świergiel, J. Compliance of the Stokes–Einstein model and breakdown of the Stokes–Einstein–Debye model for a urea-based supramolecular polymer of high viscosity / J. Świergiel, L. Bouteiller, J. Jadżyn // *Soft Matter*. - 2014. - Vol.10, N 42. - P. 8457–8463.
80. Takasu, K. Synthesis and evaluation of beta-carbolinium cations as new antimalarial agents based on pi-delocalized lipophilic cation (DLC) hypothesis / K. Takasu, T. Shimogama, C. Saiin, H.-S. Kim, Y. Wataya, R. Brun, et al. // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. - 2005, Vol. 53. - P. 653-661.
81. Tang, B. Simultaneous Extraction of Flavonoids from *Chamaecyparis obtusa* Using Deep Eutectic solvents as Additives of Conventional Extractions Solvents / B. Tang, H.E. Park, K.H. Row // *J. Chromatogr. Sci.* - 2015. - Vol. 53. - P. 836–840.
82. Tang, W. Evaluating ternary deep eutectic solvents as novel media for extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba* / W. Tang, G. Li, B. Chen, T. Zhu, K.H. Row // *Sep. Sci. Technol.* - 2017. - Vol. 52. - P. 91–99.
83. Tian, H. Recovery of Natural Products from Deep Eutectic Solvents by Mimicking Denaturation / H. Tian, J. Wang, Y. Li, W. Bi, D.D.Y Chen // *ACS Sustain. Chem. Eng.* - 2019. - Vol. 7/ - P. 9976–9983.
84. Tian, M. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization / W. Bi, M. Tian, K.H. Row // *Journal of Chromatography A*. - 2013. - Vol.1285. - P. 22–30.
85. Wang, Y. Roles of a hydrogen bond donor and a hydrogen bond acceptor in the extraction of toluene from n-heptane using deep eutectic solvents / Y. Wang, Y. Hou, W. Wu, D. Liu, Y. Ji, S. Ren // *Green Chem.* - 2016. - Vol. 18. - P. 3089–3097.
86. Wen, Q. Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents / Q. Wen, J.-X. Chen, Y.-L. Tang, J. Wang, Z. Yang // *Chemosphere*. - 2015. - Vol. 132. - P. 63-69.

87. Wu, B.P. Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: activity, stability and structure / B.P. Wu, Q. Wen, H. Xu, Z. Yang // *J. Mol. Catal. B Enzym* 101. - 2014. - P. 101-107.
88. Xu, M. Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent / M. Xu, L. Ran, N. Chen, X. Fan, D. Ren, L. Yi // *Food Chem.* - 2019. - Vol. 297.
89. Yao, X.-H. Preparation and determination of phenolic compounds from *Pyrola Incarnata* Fisch. with a green polyols based-deep eutectic solvent / X.-H. Yao, D.-Y. Zhang, M.-H. Duan, Q. Cui, W.-J. Xu, M. Luo; C.-Y. Li, Y.-G. Zu, Y.-J. Fu // *Sep. Purif. Technol.* - 2015. - Vol. 149. - P. 116–123.
90. Zhao, H. Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil / H. Zhao, C. Zhang, T.D. Crittle // *J. Mol. Catal. B Enzym.* - 2013. - P. 243-247.
91. Zhao, H. Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents / H. Zhao, G.A. Baker, S. Holmes // *J. Mol. Catal. B Enzym.* - 2011. - P. 72. - P. 163-167.
92. Zhuang, B. Deep eutectic solvents as green media for extraction of flavonoid glycosides and aglycones from *Platycladi Cacumen* / B. Zhuang, L.-L. Dou, P. Li, E.-H. Liu // *J. Pharm. Biomed. Anal.* - 2017. - Vol. 134. - P. 214–219.
93. Zong, M.-H. Evaluation of toxicity and biodegradability of cholinium amino acids ionic liquids / M.-H. Zong, X.-D. Hou, Q.-P. Liu, T. J. Smith, N. Li // *PLoS One.* - 2013. - Vol. 8, N 3.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БАВ – биологически-активные вещества
- ВАК – Высшая аттестационная комиссия
- ВИЛАР – Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений
- ГОСТ – Государственный Стандарт
- ГФ РФ – Государственная Фармакопея Российской Федерации
- ГЭР – глубокие эвтектические растворители
- ИК – инфракрасная спектроскопия
- МГМСУ – Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова
- МГУ – Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
- НИИ – научно-исследовательский институт
- ОФС – общая фармакопейная статья
- ПЭГ-400 – полиэтиленгликоль-400
- СО – стандартный образец
- $T_{пл}$ – температура плавления
- УФ - ультрафиолетовый
- УЭЖХ-МС/МС - ультраэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
- ФС – фармакопейная статья
- ФФМ – факультет фундаментальной медицины
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- ССО – линия клеток яичников канального сомика
- НВА – акцептор водородной связи (hydrogen bond acceptor)
- НВД – донор водородной связи (hydrogen bond donor)
- LD50 – средняя летальная доза
- МІЛ – материалы института Лавуазье
- M_w – молекулярная масса

ПРИЛОЖЕНИЯ

МАКРО- И МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАСТИТЕЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ

Задача макро- и микроскопического анализа растительной композиции - определение критериев подлинности разработанной композиции с подтверждением морфолого-анатомических диагностических признаков ее компонентов.

То обстоятельство, что модельная композиция состоит из четырех видов лекарственного растительного сырья одной морфологической группы (травы), три из которых принадлежат одному семейству – *Lamiaceae*, представляет определенные трудности при дифференцировке компонентов, имеющих сходные признаки. В связи с этим нами предварительно были описаны и получены изображения отдельных компонентов растительной композиции под стереомикроскопом, что позволило в дальнейшем установить в смеси принадлежность тех или иных частиц к определенным составляющим композиции.

При проведении *макроскопического анализа* (рисунок 1) было установлено, что растительная композиция представляет собой смесь кусочков листьев светло-зеленого, зеленого и коричневатого цвета различной степени опушенности, фрагментов стеблей зеленого и коричневатого цвета, частей околоцветника беловатого и светло-зеленого цвета и отдельных цветков коричнево-зеленоватого, желтоватого и розовато-фиолетового цвета, проходящую сквозь сито с размером отверстий не более 7 мм.



Рисунок 1 - Макроскопический анализ растительной композиции. Внешние признаки измельченной травы: 1 - внешние признаки измельченной травы зверобоя (стереомикроскоп увел. $\times 10$); 2 - внешние признаки измельченной травы пустырника (стереомикроскоп увел. $\times 15$); 3 - внешние признаки измельченной травы мяты (стереомикроскоп увел. $\times 10$); 4 - внешние признаки измельченной травы чабреца (стереомикроскоп увел. $\times 10$).

При исследовании внешних признаков растительного сырья, входящего в состав модельной композиции, невооруженным глазом и под лупой видны:

– кусочки четырехгранного стебля с гранями серовато-зеленого цвета снаружи (при этом сердцевина стебля беловато-кремового цвета и пористой структуры), фрагменты опушенных листьев от темно- до коричневатого-зеленого цвета; кусочки коричнево-зеленой трубчато-колокольчатой с пятью шиловидно-заостренными зубцами чашечки; кусочки двугубого венчика розовато-фиолетового цвета. Все фрагменты растительного сырья обильно покрыты тонкими волосками, заметны блестящие золотисто-прозрачные железки (трава пустырника);

– кусочки цветоносов и стеблей, на изломе беловатого цвета, чаще в продольном сечении; кусочки продолговатых и продолговато-овальных, цельнокрайних листьев, неопушенных, зеленого и темно-коричневого цвета, с темно-коричневыми точками вместилищ; встречаются также цельные бутоны, их фрагменты и лепестки желтовато-коричневого цвета с коричневыми прожилками и темными точками (трава зверобоя);

– кусочки четырехгранных стеблей серовато-зеленого цвета с желтовато-белой губчатой сердцевинкой; кусочки листьев зеленого и серовато-зеленого цвета с многочисленными темно-коричневыми блестящими округлыми эфиромасличными железками и волосками беловатого цвета; кусочки серовато-зеленой или коричневатой чашечки и желтовато-белого венчика (трава мелиссы);

– кусочки тонких слегка опушенных стеблей красновато-коричневого цвета, четырехгранных на изломе; кусочки слабоопушенных листьев с многочисленными железками, содержащих у основания пластинок и на черешках длинные редкие щетинистые волоски; мелкие одиночные цветки или фрагменты цветков синевато-фиолетового цвета с коричневатой-красной опушенной чашечкой (трава чабреца).

В ходе макроскопического анализа растительной композиции очень часто наблюдали фрагменты травы пустырника сердечного, часто – травы зверобоя продырявленного и травы мелиссы лекарственной, редко – травы тимьяна ползучего (трава чабреца). На основании данного анализа можно сделать вывод о различном соотношении частиц определенного вида растительного сырья в составе композиции (рисунок 2).

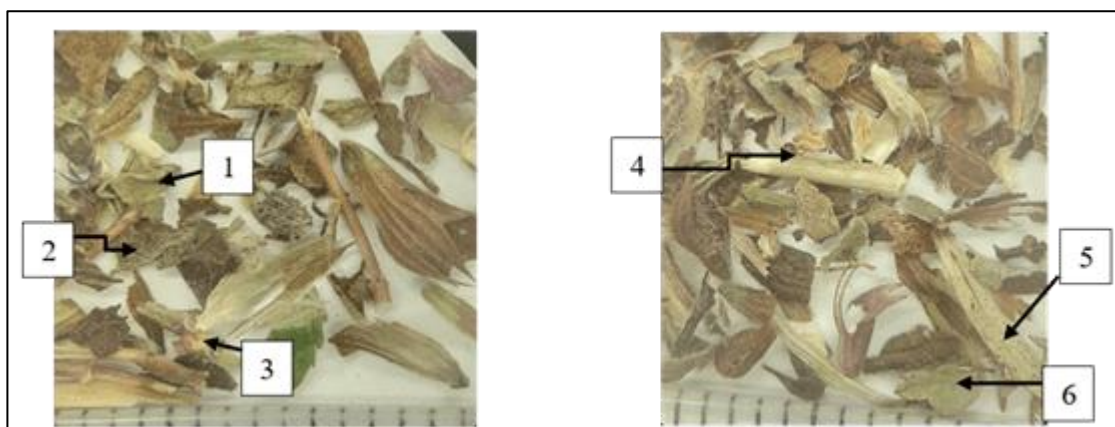


Рисунок 2 – Растительная композиция. Макроскопический анализ. Внешние признаки (стереомикроскоп увел. $\times 10$): 1, 6 – лист зверобоя; 2 – лист пустырника; 3 – цветок мелиссы; 4 – лепесток цветка зверобоя; 5 – лист чабреца.

Микроскопический анализ:

Исследование компонентов растительной композиции под микроскопом позволило определить:

– наличие фрагментов эпидермиса листа и стебля, клетки которого характеризуются тонкими извилистыми боковыми стенками. На нижнем эпидермисе представлены устьица аномоцитного типа (окруженные 3-4 околоустьичными клетками); также присутствуют фрагменты чашечки и венчика, на которых, так же, как и на частицах листа, заметны бесцветные железки округлой формы, на короткой ножке с головкой, состоящей из 4-6 клеток. Удаётся распознать и наличие волосков: одно- и многоклеточных грубобородавчатых и мелких головчатых (одно- (реже двух-) клеточная ножка с одно-двухклеточной головкой) (трава пустырника) (рисунок 3);

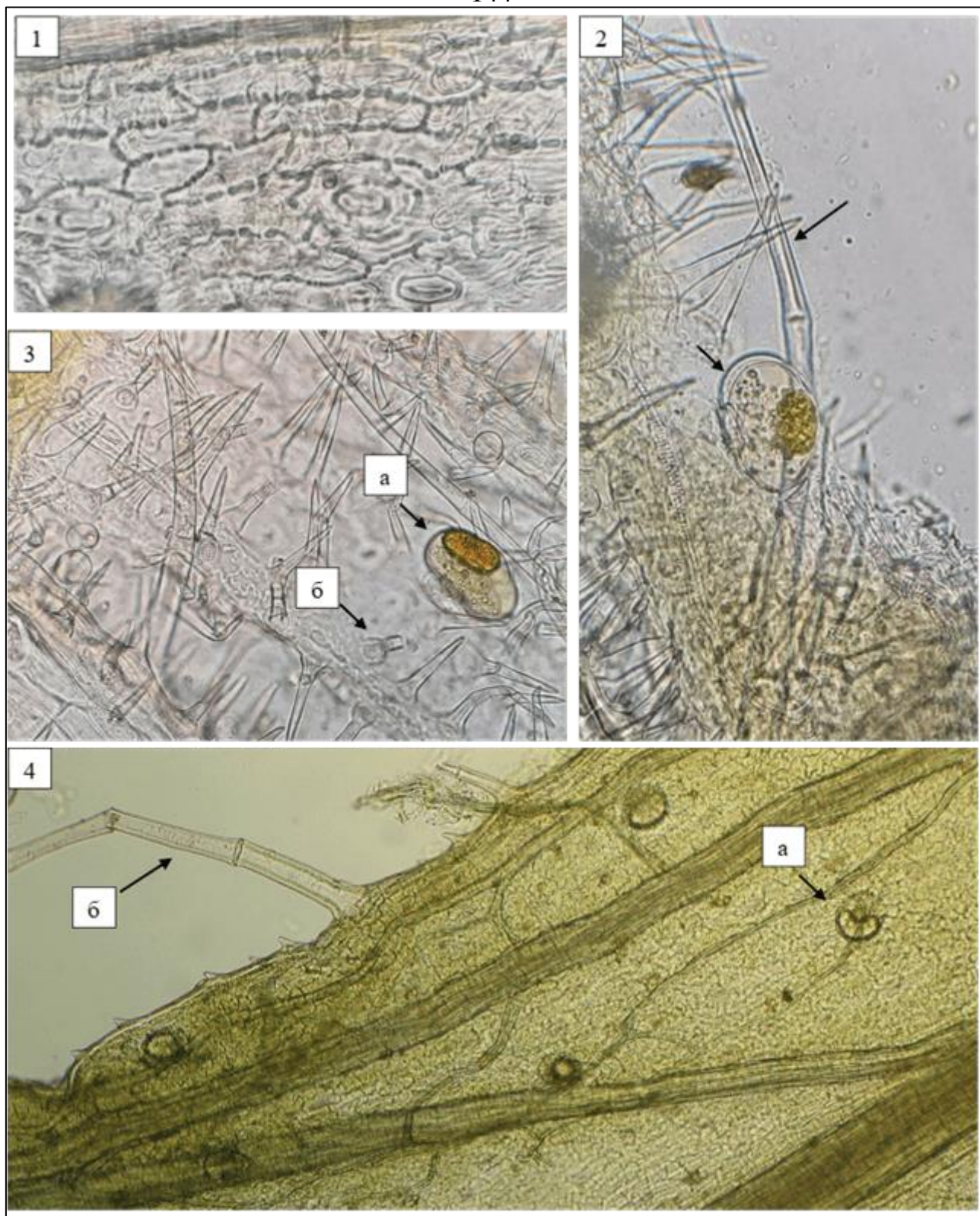


Рисунок 3 – Растительная композиция. Трава пустырника: 1 – фрагмент эпидермиса листа: устьичный комплекс аномоцитного типа (увел. $\times 400$); 2 – фрагмент края листа: эфиромасличная железа, простой многоклеточный волосок (увел. $\times 400$); 3 – фрагмент листа, эфиромасличная железа (а), железистый волосок (б) (увел. $\times 400$); 4 - фрагмент чашечки, эфиромасличная железа (а), простой многоклеточный волосок (б) (увел. $\times 100$).

– наличие фрагментов эпидермиса листа и стебля, клетки которого характеризуются извилистыми стенками с четковидными утолщениями и устьицами аномоцитного типа (окружены 3-4 околоустьичными клетками). В мезофилле листа видны вместилища трех типов: бесцветные округлые по всей поверхности и вместилища с маслянистым содержимым: продолговатые вдоль жилок и округлые с темным пигментированным содержимым по краю листа. Цветки содержат тычинки с 2 пыльниками, несущими гладкие пыльцевые зерна (трава зверобоя) (рисунок 4);

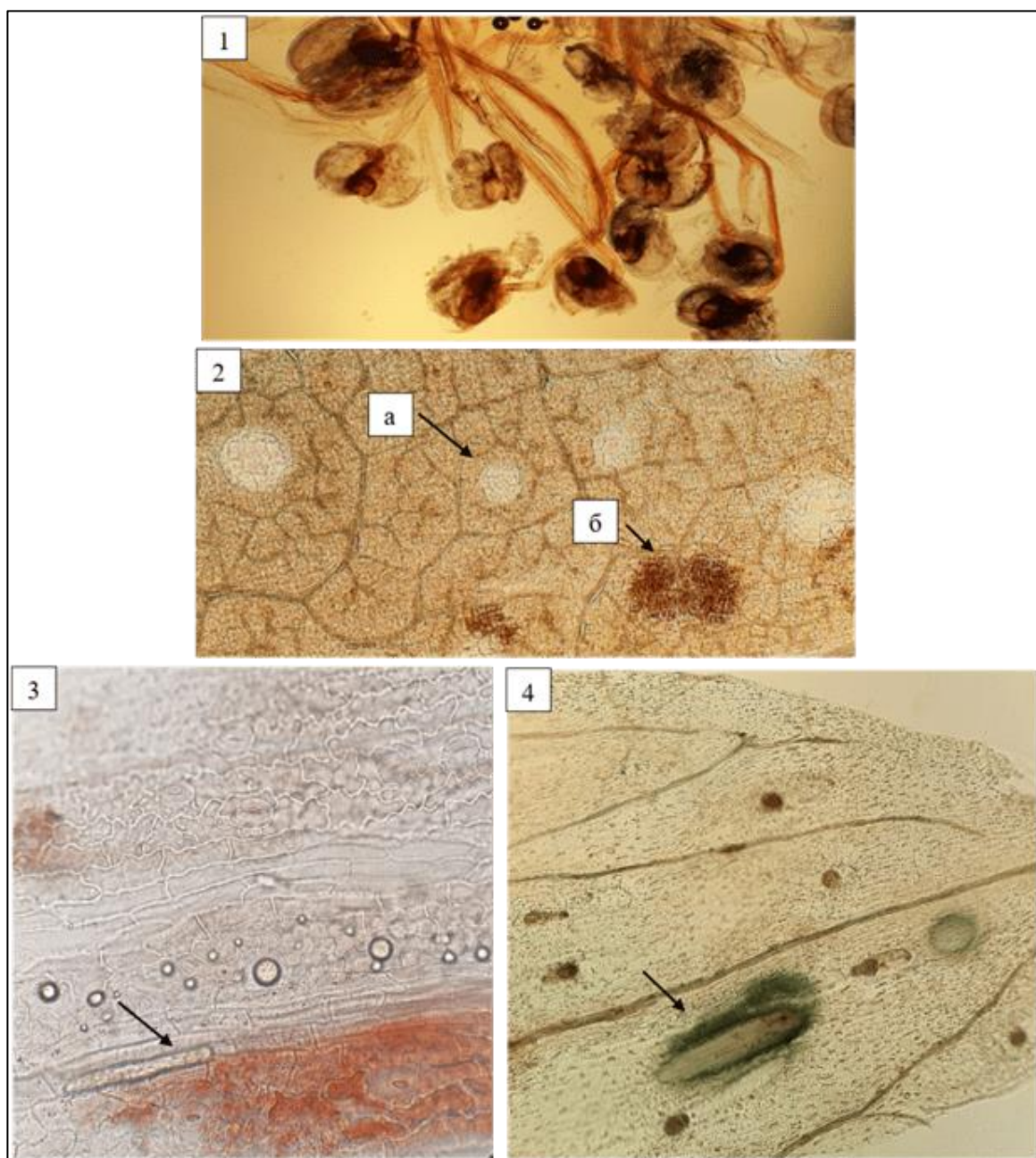


Рисунок 4 - Растительная композиция. Трава зверобоя: 1 – фрагмент цветка с тычинками (увел. $\times 40$); 2 – фрагмент листа, округлые бесцветные вместилища (а) и вместилища с маслянистым пигментированным содержимым (б) (увел. $\times 40$); 3 – фрагмент листа, продолговатые вместилища вдоль жилок с маслянистым содержимым (увел. $\times 400$); 4 – фрагмент лепестка, крупные вместилища с пигментированным содержимым (увел. $\times 40$).

– фрагменты эпидермиса листа и стебля с удлинёнными клетками с четковидно-утолщённой клеточной стенкой и устьичным комплексом диацидного типа. Встречаются эфиромасличные железки, с короткой одноклеточной ножкой и восьмиклеточной округлой головкой. Видны волоски трех типов: простые короткие одноклеточные сосочковидные, простые длинные

многоклеточные с грубобородавчатой кутикулой и железистые с одноклеточной ножкой и овальной одно-трехклеточной головкой (трава мелиссы) (рисунок 5);

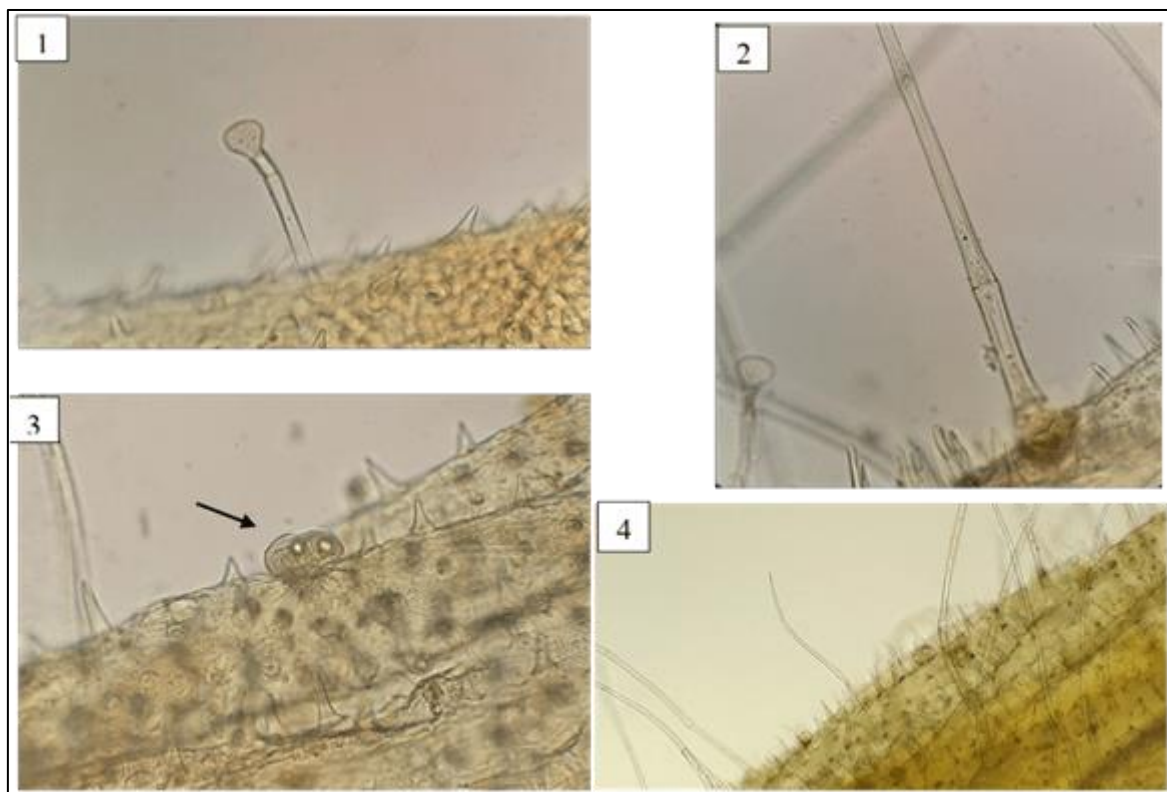


Рисунок 5 - Растительная композиция. Трава мелиссы, листовая пластинка: 1 – головчатый волосок (увел. $\times 400$); 2 – простой многоклеточный волосок (увел. $\times 400$); 3 – эфиромасличная железка (увел. $\times 400$); 4 – трихомы (увел. $\times 40$).

– кусочки эпидермиса листа и стебля с извилистыми клетками с четковидными утолщениями стенок, диацитным типом устьичного комплекса, многочисленными крупными эфиромасличными железками (круглыми с 8 выделительными клетками, причем клетки эпидермиса могут образовывать розетку вокруг места их прикрепления). Встречаются простые крупные многоклеточные бородавчатые волоски, головчатые волоски на короткой ножке с одноклеточной головкой, а также выросты эпидермиса сосковидной формы. Видны и элементы цветка (чашечки и венчика) с эфиромасличными железками и волосками тех же типов, что и на листе и стебле (трава чабреца) (рисунок 6).

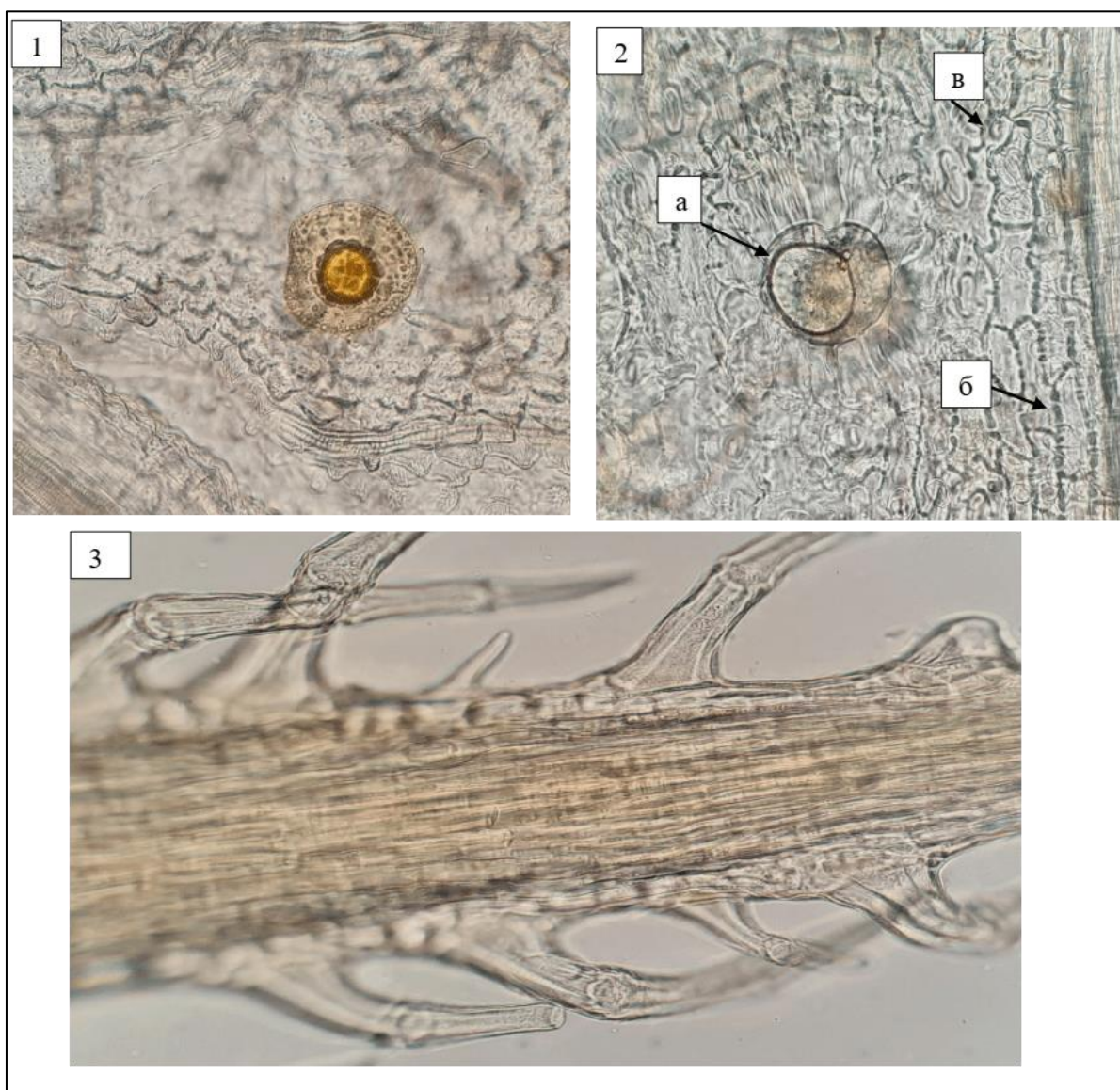


Рисунок 6 - Растительная композиция. Трава чабреца: 1 – венчик цветка, эфиромасличными железка (увел. $\times 400$); 2 – фрагмент листа: эфиромасличная железка (а), четковидная утолщенность клеточных стенок (б); устьичный комплекс диацитного типа (в) (увел. $\times 400$); 3 – фрагмент чашечки цветка, простые многоклеточные волоски (увел. $\times 400$).

Таким образом, были определены характеристики подлинности модельной растительной композиции, включающие описание внешних признаков и микроскопический анализ.

УТВЕРЖДАЮДиректор ФГБНУ ВИЛАР
Академик РАН

Н.И. Сидельников

«14» февраля 2023 г.



ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ
по получению эвтектического извлечения из растительной композиции
для производства лекарственных препаратов

флаконы по 50,0, 100,0
по ТИ – 72.19.30-001-2022

РАЗРАБОТАНО:

Главный научный сотрудник
экспериментально – технологического
отдела Центра химии и фармацевтической
технологии

 Джавахян М.А.

Соискатель ФГБНУ ВИЛАР

Прохогина Ю.Э.



Москва
2023



ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ 6 /2023 (код исследования б)
по теме НИР (122022600102-6 FGUU-2022-0010) «Доклиническое изучение
«острой» токсичности растительной композиции, полученной
эвтектическим растворителем на мышах линии BALB/c"

Исследуемые препараты:

1. Извлечение из растительной композиции, полученное эвтектическим растворителем, представлено в виде прозрачной жидкости насыщенного коричневого цвета со специфическим запахом трав. Серия 25-09-2022, передан 28.09.2022 из Центра химии и фармацевтической технологии.

Состав:

Трава пустырника (сем. Яснотковые) <i>Leonurus cardiaca</i> L.	– 40%
Трава зверобоя продырявленного (сем. Яснотковые)	
<i>Hypericum perforatum</i> L.	– 25%
Трава Melissa лекарственной (сем. Яснотковые)	
<i>Melissa officinalis</i> L.	– 25%
Трава тимьяна ползучего (сем. Яснотковые) <i>Thymus serpyllum</i> L.	– 10%
Эвтектический растворитель следующего состава:	
холина хлорид – 29,3%,	
глюкоза – 18,9%,	
вода 51,8%	

2. Спиртовое извлечение из растительной композиции. Экстрагент спирт этиловый 70%. Образец - прозрачная жидкость насыщенного коричневого цвета со специфическим запахом трав. Серия 25-09-2022, передан 28.09.2022 из Центра химии и фармацевтической технологии.

Состав:

Трава пустырника (сем. Яснотковые) <i>Leonurus cardiaca</i> L.	– 40%
Трава зверобоя продырявленного (сем. Яснотковые)	
<i>Hypericum perforatum</i> L.	– 25%
Трава Melissa лекарственной (сем. Яснотковые)	
<i>Melissa officinalis</i> L.	– 25%
Трава тимьяна ползучего (сем. Яснотковые) <i>Thymus serpyllum</i> L.	– 10%
Спирт этиловый 70%	

3. Плацебо - прозрачный бесцветный вязкий раствор при нагревании до 60° С, при комнатной температуре превращается в гелеобразную массу. Серия 25-09-2022, передан 28.09.2022 из Центра химии и фармацевтической технологии.

Состав:

Холина хлорид – 2 моль (58,5%)
Глюкоза – 1 моль (37,7%)
Вода – 1 моль (3,8%)

Тест-система: мышцы-самцы линии BALB/c.

Получение животных: Питомник ФГБНУ ВИЛАР

в количестве 45 особей (самцы) массой тела 18-20 г.

Условия содержания и кормления: Мышей содержали в полипропиленовых клетках размером 460x300x160 мм по 10 животных в каждой. В качестве подстилки использовали стерилизованные древесные опилки (сертификат соответствия № РОСС RU.10НА39.Л5195 с 24.05.2022 по 23.05.2025). В качестве корма использовали стандартный полнорационный экструдированный комбикорм для лабораторных животных (мыши) (ООО «Лабораторкорм», Россия; удостоверение качества и безопасности комбикорма рецепт ПК-120-1_45 ГОСТ 34566-2019 от 19.09.2022 г). Водопроводную воду давали *ad libitum* в стандартных поилках.

Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 20-22°C и относительная влажность 50-60%.

Нормативные ссылки: Исследования выполнены согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации: «Национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012 г.), и в соответствии с Федеральными законами от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и от 22.12.2014 г. N 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств».

Эксперименты на животных проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986).

План эксперимента одобрен биоэтической комиссией института. Протокол №85 от 10.10.2022.

Экспериментальная часть (СОП ОТ-30-2016) Определение острой токсичности методом пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксоу.

Подготовка рабочих растворов:

1. Плацебо вводили в виде раствора, предварительно нагретого до температуры 30°C, а также в разведениях с дистиллированной водой в соотношении 1:1; 1:4.

2. Извлечение из растительной композиции, полученное эвтектическим растворителем вводили в нативном виде.

3. Спиртовое извлечение из растительной композиции перед введением животным предварительно деалкаголизировали на вакуумном роторном испарителе *Heidolph*, производства Германии, при определенных параметрах установки: вакууме 65 мм.рт.ст., скорости 75 об/мин, температуре водяной бани 61° С. Исходный объем спиртового извлечения 25 мл упаривали до объема 4 мл, затем доводили дистиллированной водой до первоначального объема. Рабочий раствор препарата не содержал этанола,

согласно показаниям ареометра (набор ареометров АОН – 1, 700-1840, ГОСТ 18481– 81, Россия).

Введение рабочих растворов:

В условиях «острого» эксперимента при двукратном внутрижелудочном введении исследуемых веществ были использованы объёмы, которые соответствовали максимально возможными по объёму при внутрижелудочном введении мышам.

Результаты исследования (картина интоксикации):

1. При введении Плацебо в дозе 25 мл/кг (0,5 мл /20 г массы тела **без разведения**) в первые минуты отмечали возбуждение, судороги и гибель всех животных в течение 3-5 минут; при введении дозы 25 мл/кг (0,5 мл /20г массы тела **в разведение 1:1**) наблюдали аналогичную картину отравления, но первая гибель животных наступала через 3 минуты и длилась в течение часа. Погибли все животные. При введении плацебо в дозе 25 мл/кг (0,5 мл /20 г массы тела **в разведение 1:4**) картина отравления менее выражена: через 10 минут наблюдали гиподинамию, через 25-30 минут – птоз верхнего века у 3 из 5 мышей, вздутие кишечника. На протяжении двух последующих дней отмечали неоформленный (пастообразный) кал. Гибели мышей на протяжении 14 дней не регистрировали.

2. При однократном введении мышам **извлечения из растительной композиции, полученное эвтектическим растворителем**, в дозе 25 мл/кг (0,5 мл /20 г массы тела), в первые минуты отмечали возбуждение, которое характеризовалось гиперкинезами, подпрыгиваниями вверх, судорогами; через 10 минут отмечали гибель 1 мыши из 6. При повторном введении через 20 минут в том же объеме эвтектического извлечения (в сумме доза 50 мл/кг - 1,0 мл/20 г массы тела) у 5-ти оставшихся в живых мышей сразу после введения регистрировали судороги и гибель всех животных.

3. При однократном введении эвтектического извлечения в желудок мышам в объеме 0,6 мл /20 г массы тела, что соответствовало дозе 30 мл/кг, отмечали аналогичную картину отравления, описанную выше. Гибель составила 100% (5/5).

4. При введении эвтектического извлечения в дозе 20 мл/кг (0,4 мл /20 г массы тела), отмечали такую же картину отравления в течение 3-х часов, что и при введении дозы 50 и 30 мл/кг: гибель первых животных наступала через 7-10 минут и продолжалась в течение дня. Общая гибель составила 3/5.

5. Введение эвтектического извлечения в дозах 15 мл/кг (0,3 мл/20 г массы тела) и 10 мл/кг (0,2 мл/20 г массы тела) вызывало заторможенность животных, одышку, нарушение координации движений, поскрипывание зубами и вокализацию в первые 10 минут, вздутие кишечника. Интоксикация продолжалась в течение первого часа; затем признаки острого отравления исчезали. На протяжении двух дней отмечали неоформленный кал. Гибель

зарегистрирована через 7 минут после введения дозы 15 мл/кг, а при введении дозы 10 мл/кг гибели не регистрировали в течение 14 дней.

6. При введении **спиртового извлечения** из растительной композиции, предварительно деалкоголизированного, в дозе 50 мл/кг (0,5 мл/20 г массы тела двукратно с интервалом 30 минут) в первые минуты отмечали заторможенность, груминг, одышку, птоз верхнего века, через 30 минут животные становились активными, признаки интоксикации исчезали. Гибель не наступала.

Параметры токсичности:

Группа №№	Вид, пол	Количество животных	Исследуемое вещество	Доза, мл/кг (мг/кг) (г/кг)	Разведение	Режим введения, количество на 20,0 г мышь	Результат Гибель
1.	Мыши, самцы	5	Плацебо	25 мл/кг	0	в желудок, однократно, 0,5 мл	5/5
2.	Мыши, самцы	5	Плацебо	25 мл/кг	1:1	в желудок, однократно, 0,5 мл	5/5
3.	Мыши, самцы	5	Плацебо	25 мл/кг	1:4	в желудок, однократно, 0,5 мл	0/5
4.	Мыши, самцы	5	Извлечение из растительной композиции, полученное эвтектическим растворителем	50 мл/кг		в желудок, двукратно, 1,0 мл	5/5
5.	Мыши, самцы	5	Извлечение из растительной композиции, полученное эвтектическим растворителем	30 мл/кг		в желудок, однократно, 0,6 мл	5/5
6.	Мыши, самцы	5	Извлечение из растительной композиции, полученное эвтектическим растворителем	20 мл/кг		в желудок, однократно, 0,4 мл	3/5
7.	Мыши, самцы	5	Извлечение из растительной композиции, полученное эвтектическим	15 мл/кг		в желудок, однократно, 0,3 мл	1/5

			растворителем				
8.	Мыши, самцы	5	Извлечение из растительной композиции, полученное эвтектическим растворителем	10 мл/кг		в желудок, однократно, 0,2 мл	0/5
9.	Мыши, самцы	5	Спиртовое извлечение из растительной композиции	50 мл/кг		в желудок, двукратно, 1,0 мл	0/5

Таким образом, в результате изучения острой токсичности установлено, что среднесмертельная доза извлечения из растительной композиции, полученного эвтектическим растворителем, при однократном введении в желудок мышам ориентировочно составляет около 20 мл/кг массы тела мыши, а не вызывающая гибели – 10 мл/кг. С учетом коэффициента пересчета с мыши на человека однократная среднесмертельная доза составляет приблизительно 120 мл, а безопасная доза
- приблизительно 60 мл (1200 капель) для человека.

Руководитель исследования,
Зав. отделом токсикологии
ФГБНУ ВИЛАР, канд. биол.
наук



Л.В. Крепкова

подпись, дата

Ответственный исполнитель,
Старший научный сотрудник
отдела токсикологии ФГБНУ
ВИЛАР



М.В.
Боровкова

подпись, дата

Подписи Крепковой Л.В. и Боровковой М.В. заверяю.

Ученый секретарь ФГБНУ ВИЛАР,

канд. фармацевт. наук





Семкина О.А.

**УЭЖХ-ХРОМАТОГРАММЫ, МАСС-СПЕКТРЫ СОЕДИНЕНИЙ,
ЭКСТРАГИРУЕМЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ 50%-ОГО ВОДНОГО
РАСТВОРА ГЭР НА ОСНОВЕ ХОЛИНА ХЛОРИДА, ГЛЮКОЗЫ И
ВОДЫ В МОЛЬНОМ СООТНОШЕНИИ 2:1:1 В КАЧЕСТВЕ
ЭКСТРАГЕНТА**

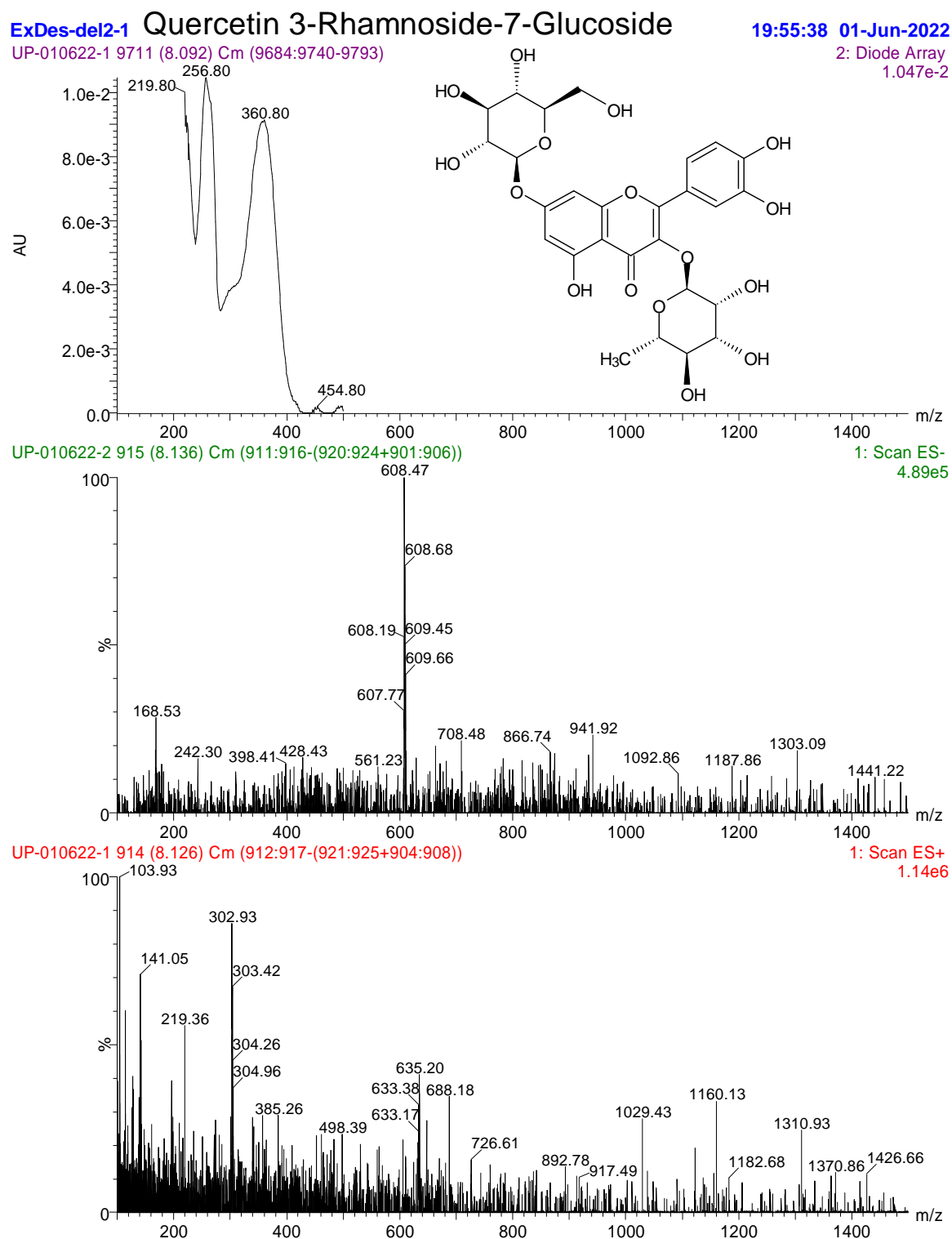


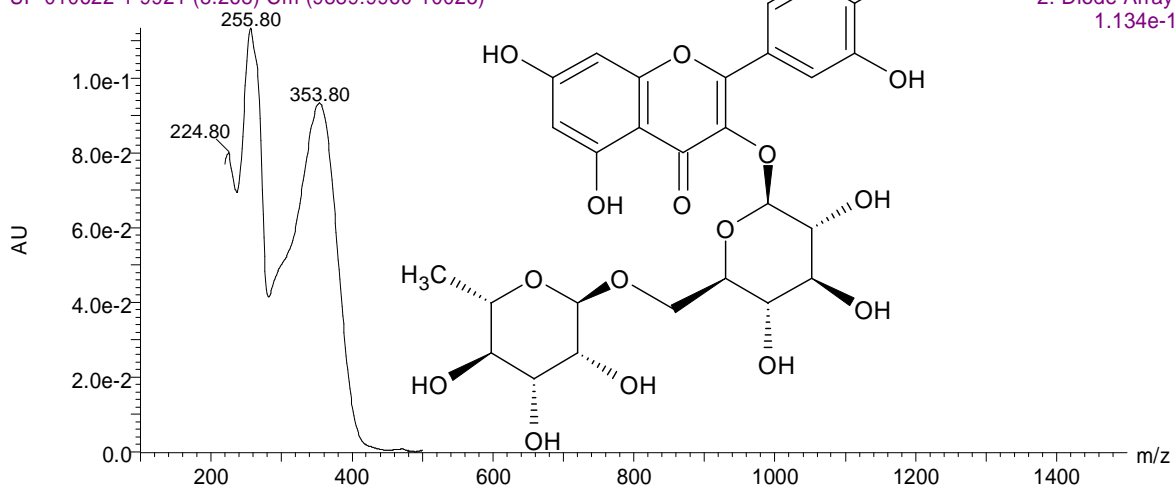
Рисунок 1 - Хроматограмма и строение гликозида кверцетина.

ExDes-del2-1 Rutin

UP-010622-1 9921 (8.268) Cm (9889:9960-10025)

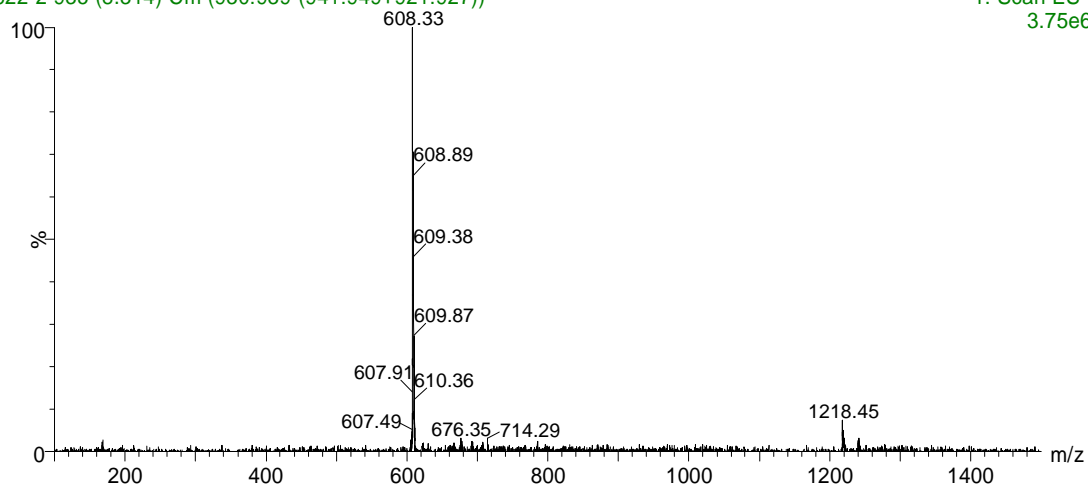
19:55:38 01-Jun-2022

2: Diode Array
1.134e-1



UP-010622-2 935 (8.314) Cm (930:939-(941:949+921:927))

1: Scan ES-
3.75e6



UP-010622-1 934 (8.304) Cm (931:939-(941:949+921:926))

1: Scan ES+
9.12e6

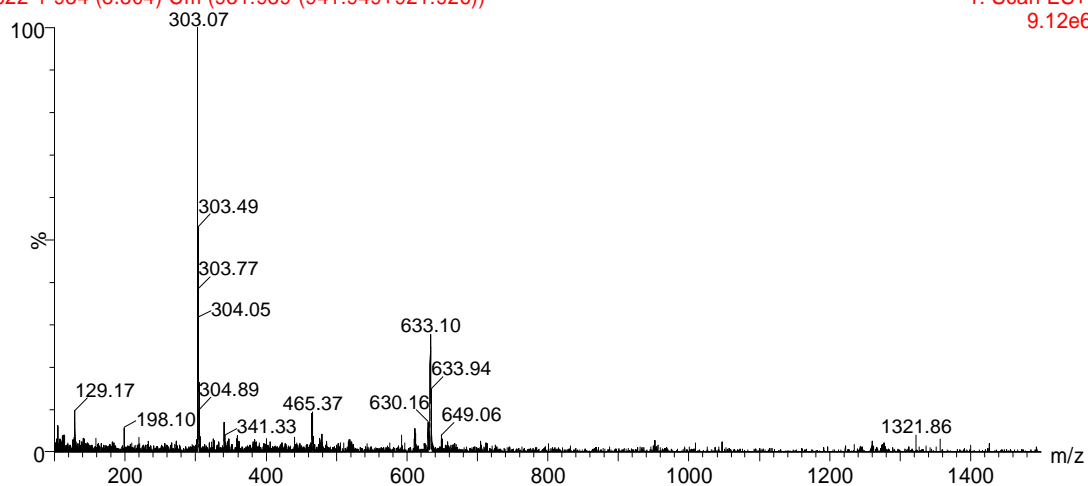
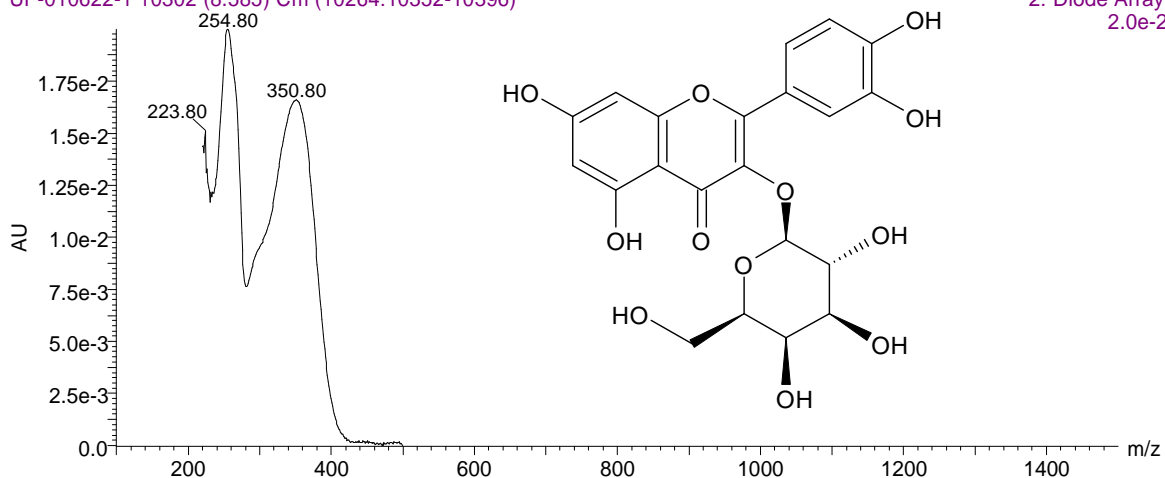


Рисунок 2 - Хроматограмма и строение рутина.

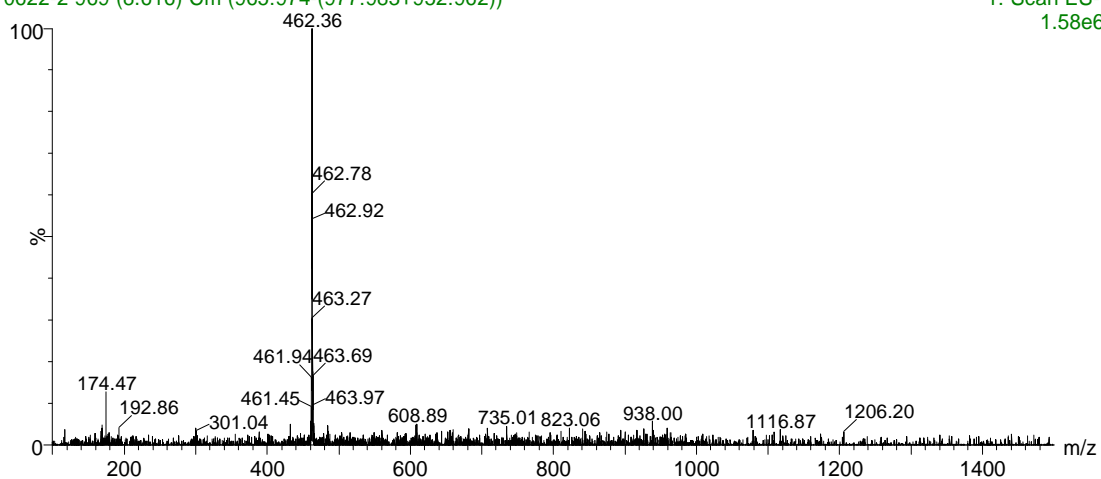
ExDes-del2-1 Quercetin-3-galactoside

19:55:38 01-Jun-2022

UP-010622-1 10302 (8.585) Cm (10264:10352-10396)

2: Diode Array
2.0e-2

UP-010622-2 969 (8.616) Cm (965:974-(977:983+952:962))

1: Scan ES-
1.58e6

UP-010622-1 969 (8.615) Cm (966:973-(977:985+957:963))

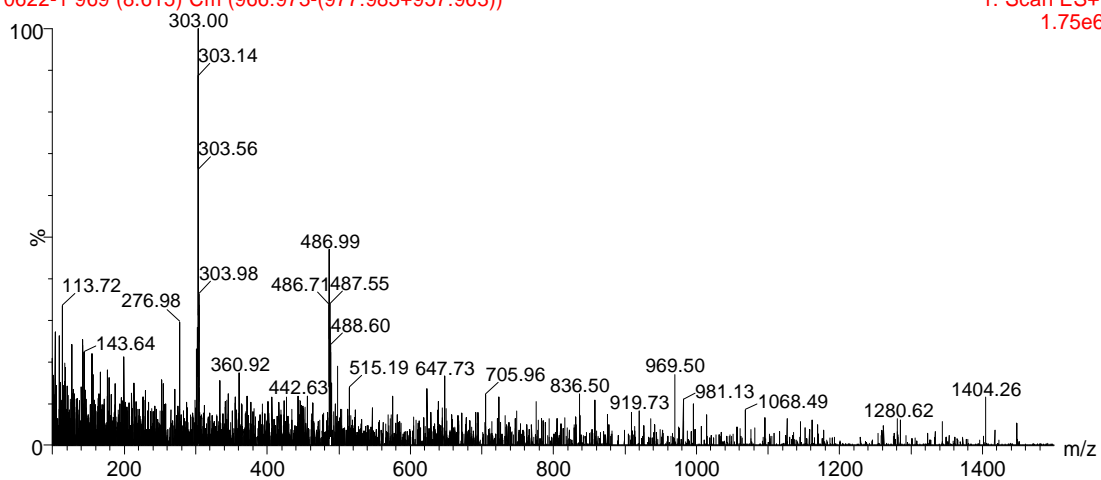
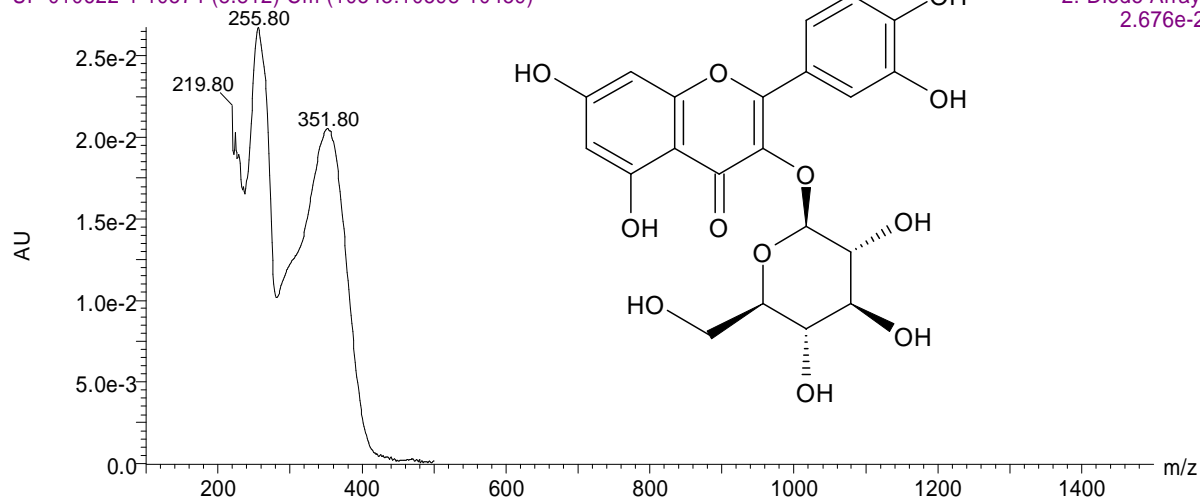
1: Scan ES+
1.75e6

Рисунок 3 - Хроматограмма и строение гиперозида.

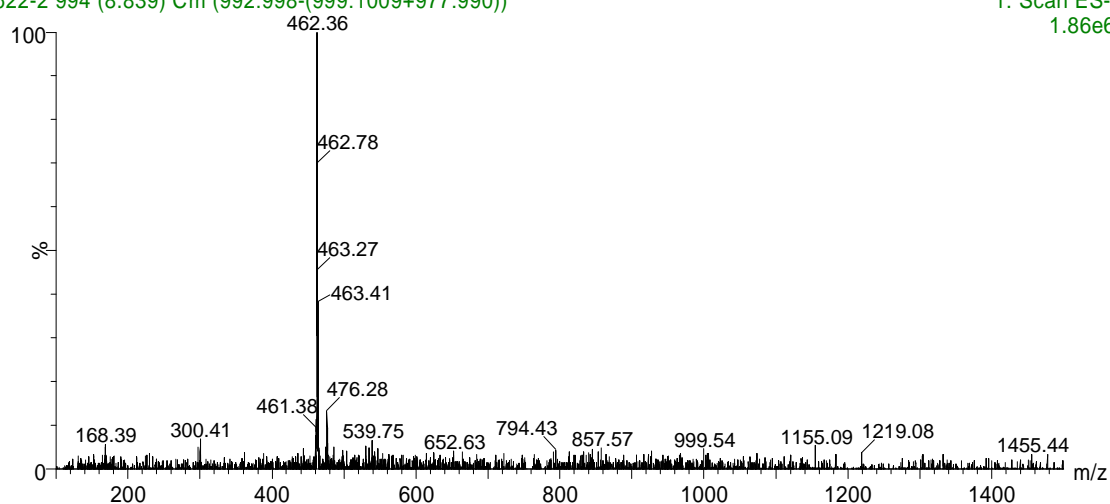
ExDes-del2-1 Quercetin-3-glucoside

UP-010622-1 10574 (8.812) Cm (10543:10598-10459)

19:55:38 01-Jun-2022

2: Diode Array
2.676e-2

UP-010622-2 994 (8.839) Cm (992:998-(999:1009+977:990))

1: Scan ES-
1.86e6

UP-010622-1 1001 (8.899) Cm (991:1001-(1002:1015+980:990))

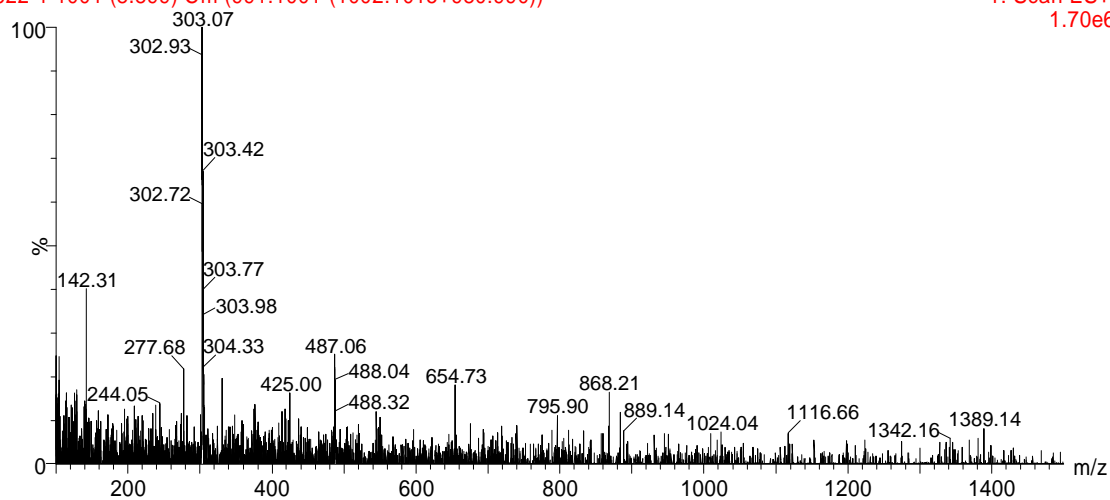
1: Scan ES+
1.70e6

Рисунок 4 - Хроматограмма и строение кверцетин-3-глюкозида.

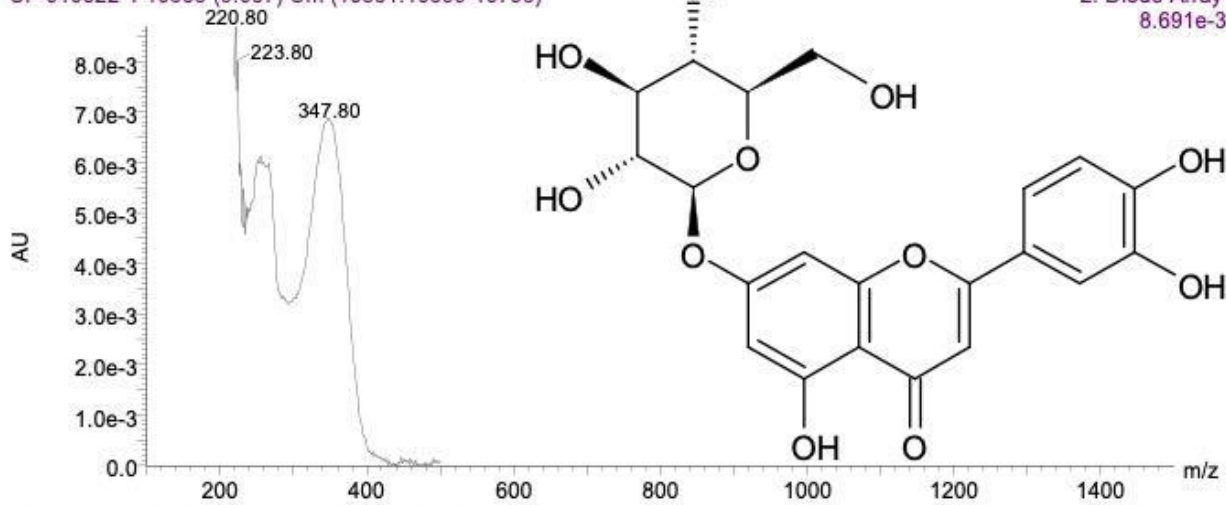
ExDes-del2-1 Luteolin-7-Glucoside

UP-010622-1 10868 (9.057) Cm (10831:10899-10798)

19:55:38 01-Jun-2022

2: Diode Array

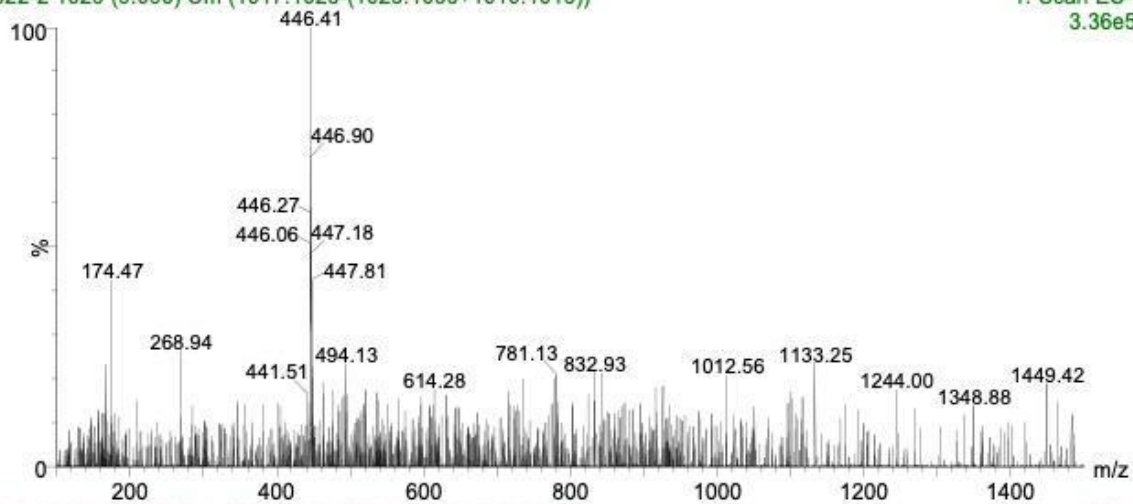
8.691e-3



UP-010622-2 1023 (9.096) Cm (1017:1023-(1025:1033+1010:1015))

1: Scan ES-

3.36e5



UP-010622-1 1027 (9.131) Cm (1020:1027-(1028:1036+1015:1019))

1: Scan ES+

7.00e5

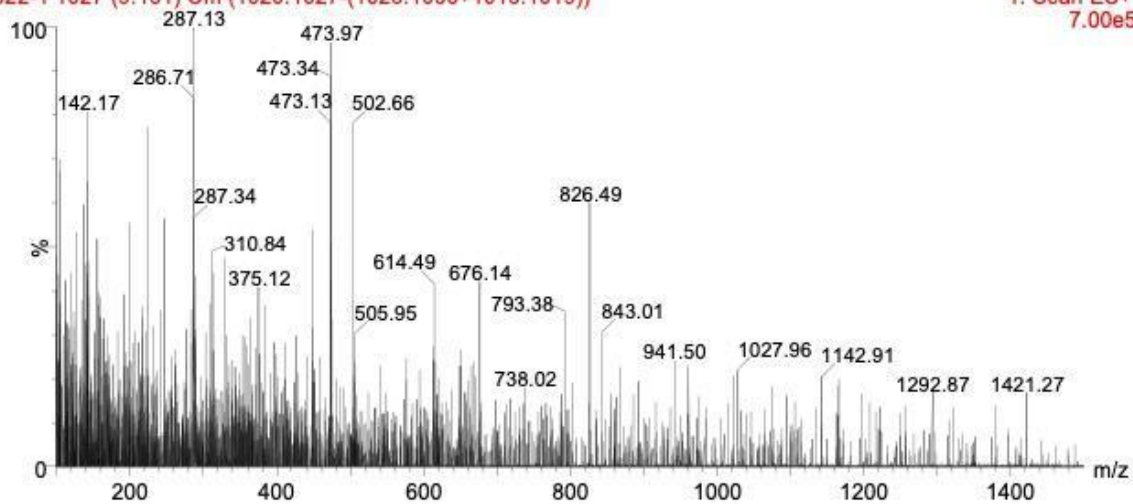


Рисунок 5 - Хроматограмма и строение лутеолин-7-глюкозида.

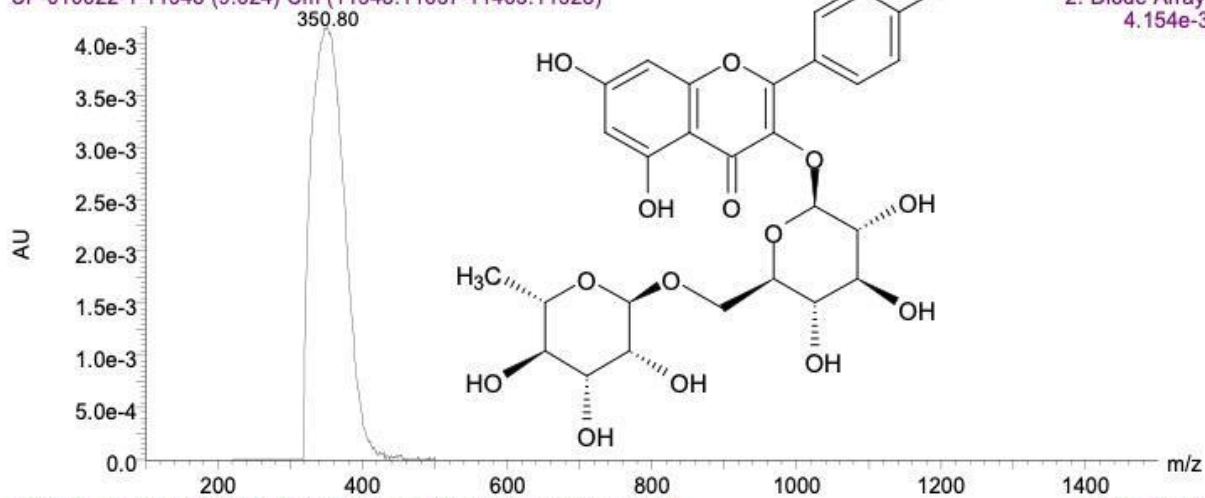
ExDes-del2-1 Kaempferol-3-Rutinoside

UP-010622-1 11548 (9.624) Cm (11548:11637-11463:11528)

19:55:38 01-Jun-2022

2: Diode Array

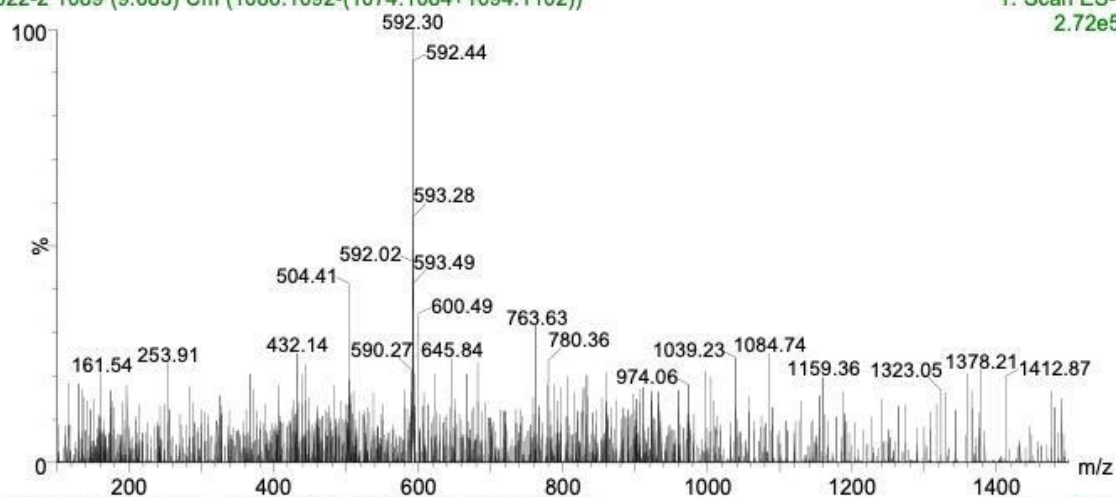
4.154e-3



UP-010622-2 1089 (9.683) Cm (1086:1092-(1074:1084+1094:1102))

1: Scan ES-

2.72e5



UP-010622-1 1091 (9.700) Cm (1087:1094-(1095:1108+1072:1086))

1: Scan ES+

6.20e5

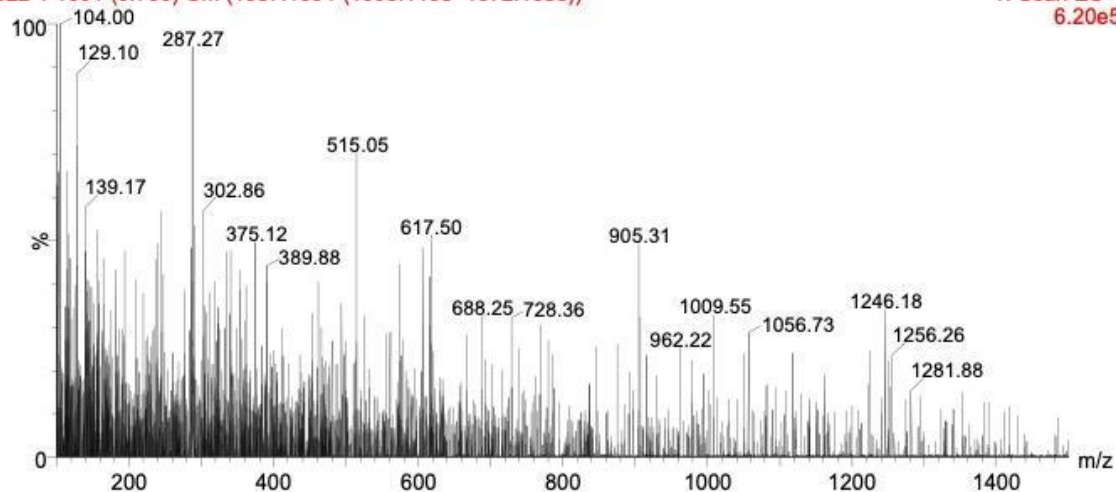


Рисунок 6 - Хроматограмма и строение кемпферол-3-рутинозида

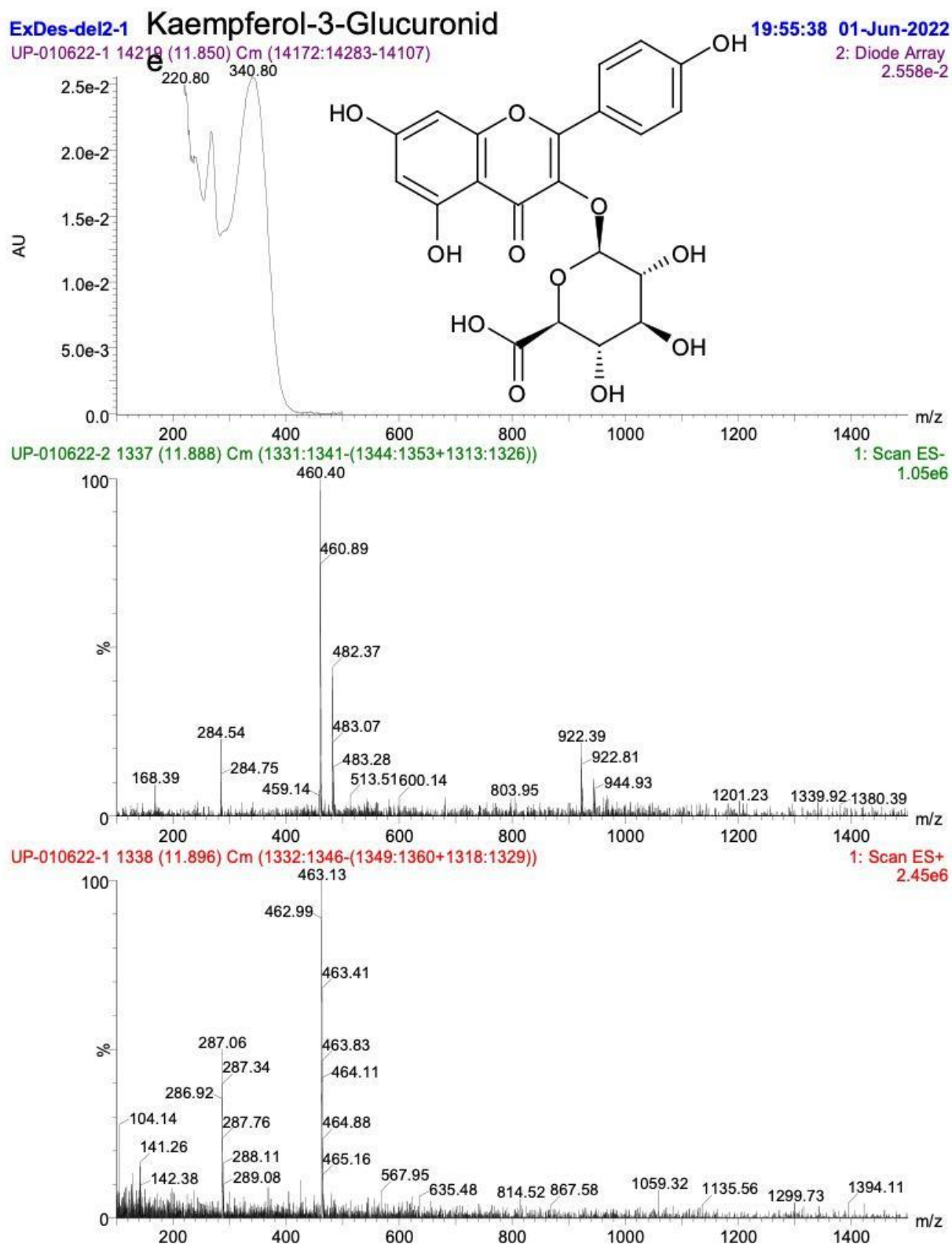


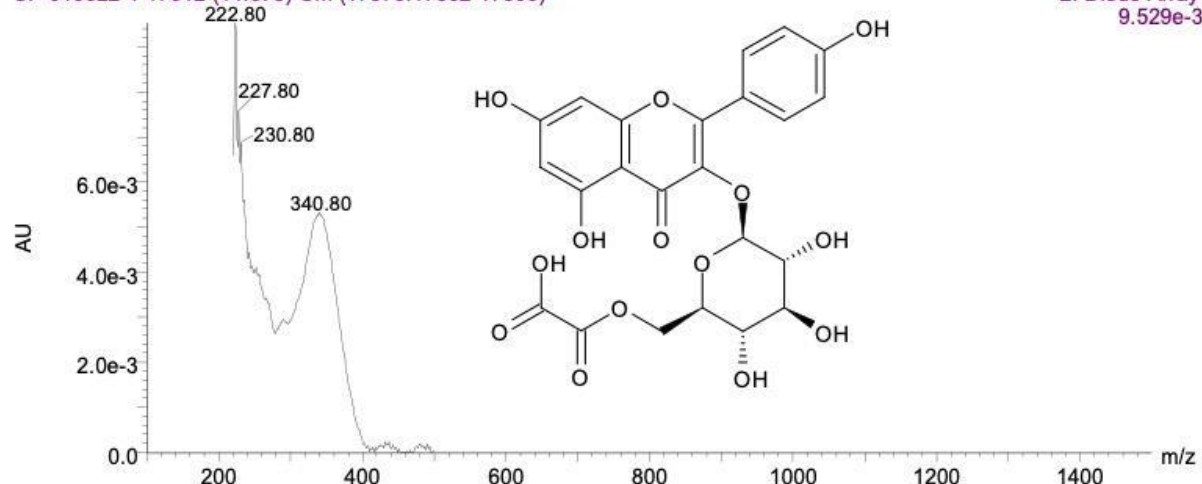
Рисунок 7 - Хроматограмма и строение кемпферол-3-глюкуронида.

ExDes-del2-1 Kaempferol-3-(6'-Oxalyl)Glucoside

UP-010622-1 17612 (14.678) Cm (17576:17662-17500)

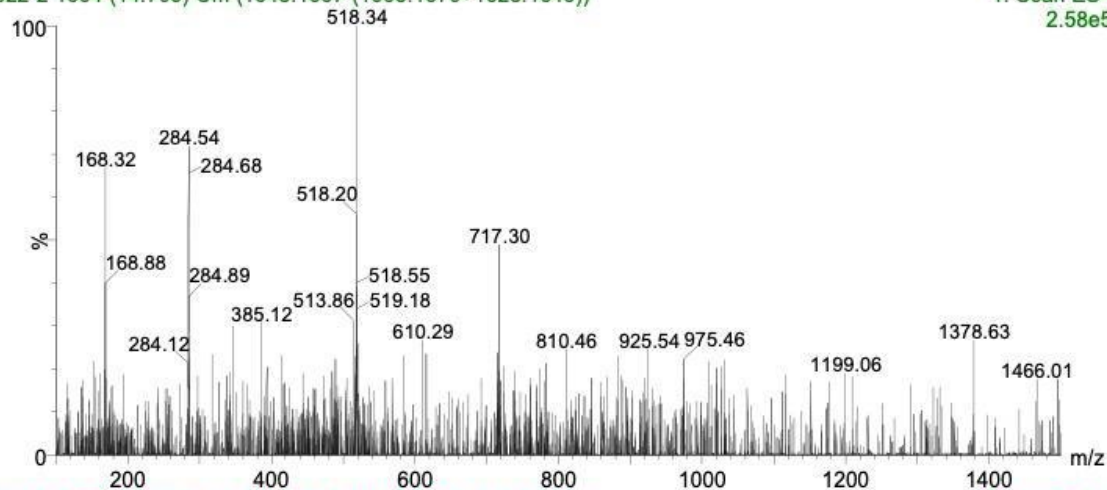
19:55:38 01-Jun-2022

2: Diode Array
9.529e-3



UP-010622-2 1654 (14.706) Cm (1648:1657-(1658:1670+1628:1645))

1: Scan ES-
2.58e5



UP-010622-1 1657 (14.732) Cm (1652:1661-(1664:1678+1636:1651))

1: Scan ES+
6.30e5

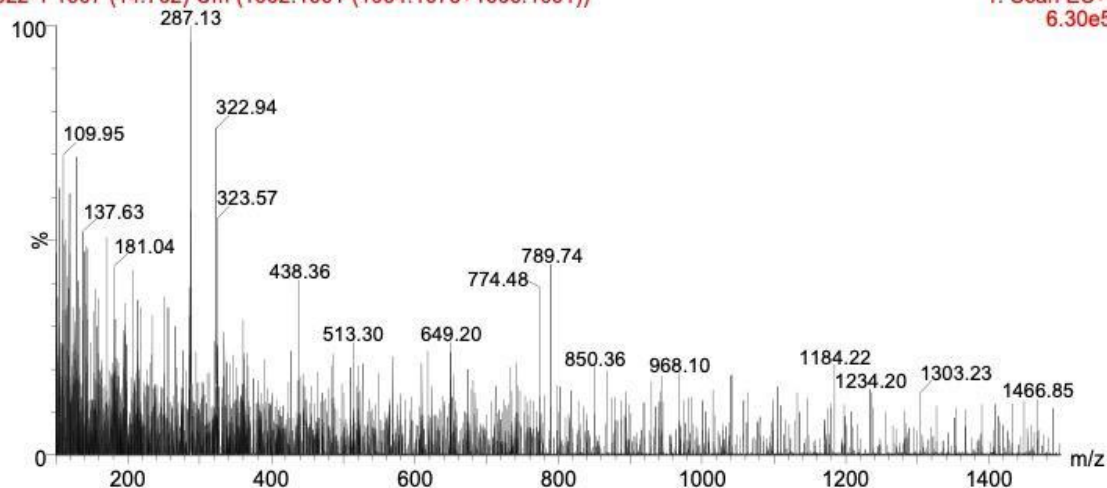


Рисунок 8 - Хроматограмма и строение кемпферол-3-(6'-оксаль)-глюкозида.

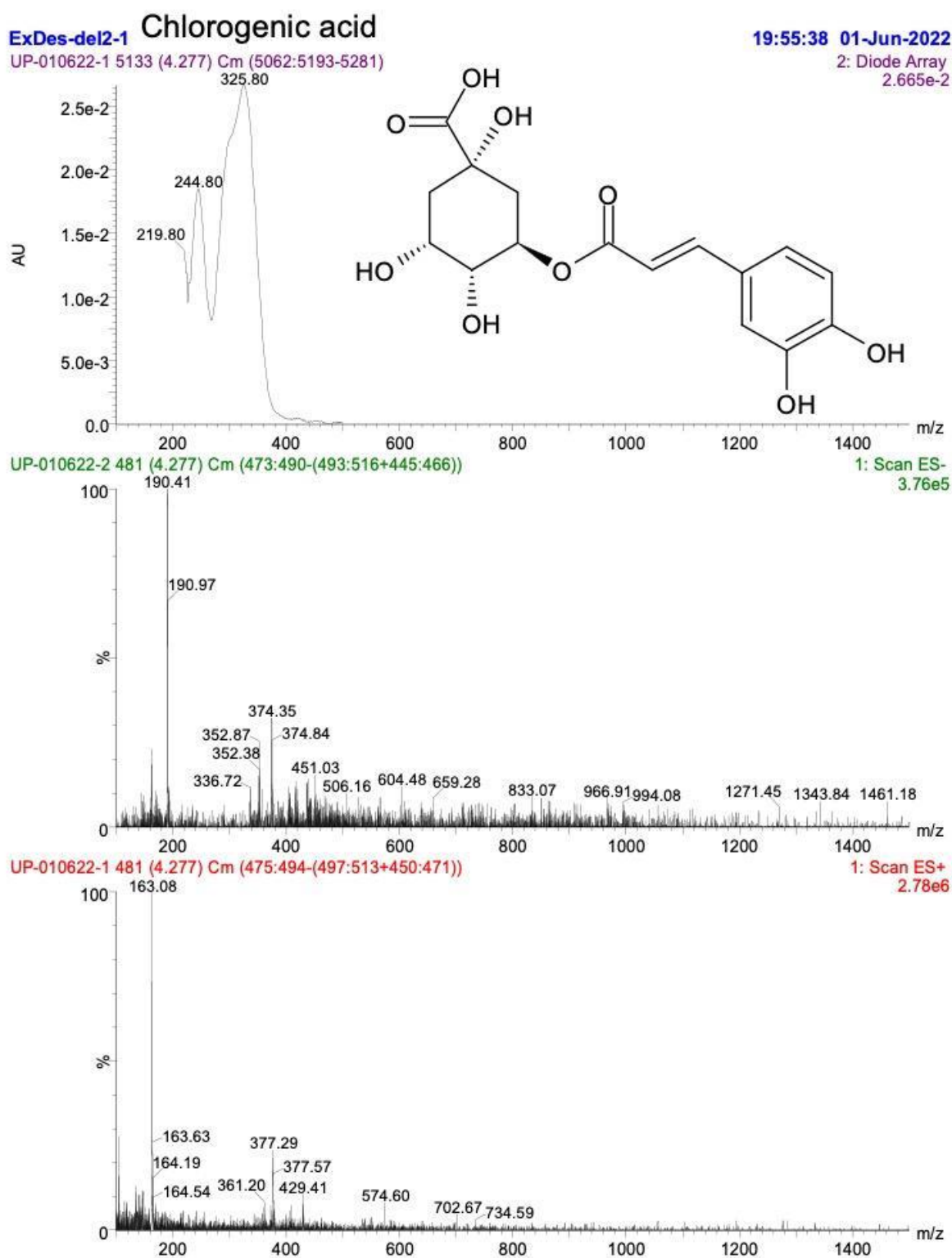


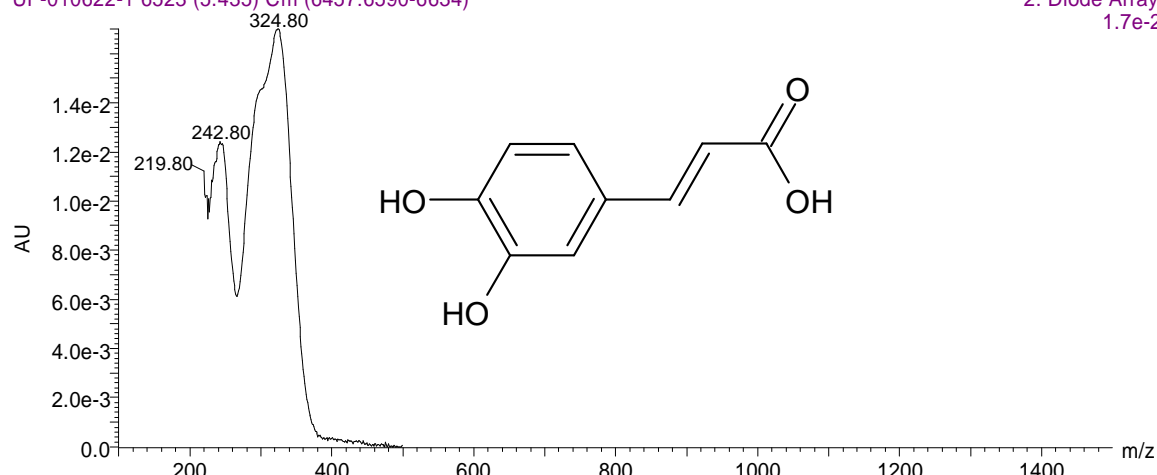
Рисунок 9 - Хроматограмма и строение хлорогеновой кислоты.

ExDes-del2-1 Caffeic Acid

UP-010622-1 6523 (5.435) Cm (6457:6590-6634)

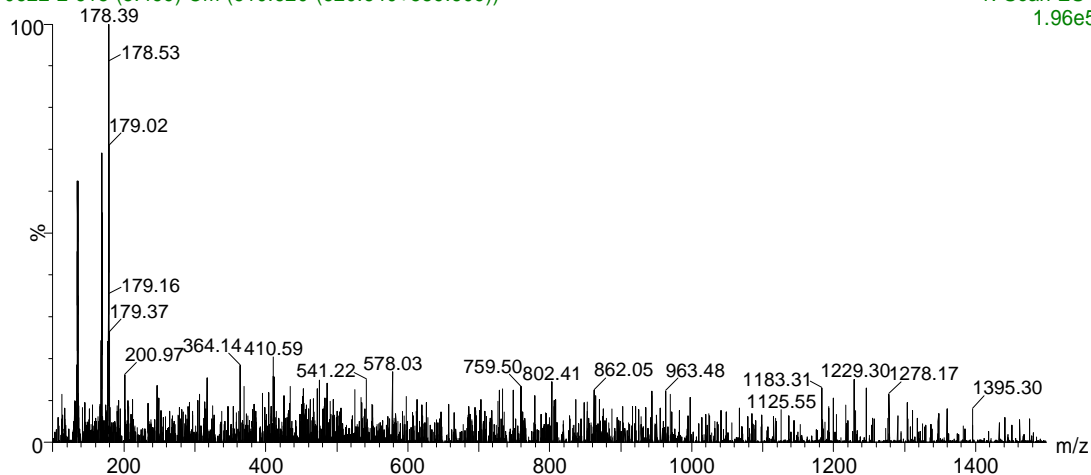
19:55:38 01-Jun-2022

2: Diode Array
1.7e-2



UP-010622-2 615 (5.469) Cm (610:620-(620:640+589:609))

1: Scan ES-
1.96e5



UP-010622-1 617 (5.485) Cm (612:622-(623:633+594:610))

1: Scan ES+
1.12e6

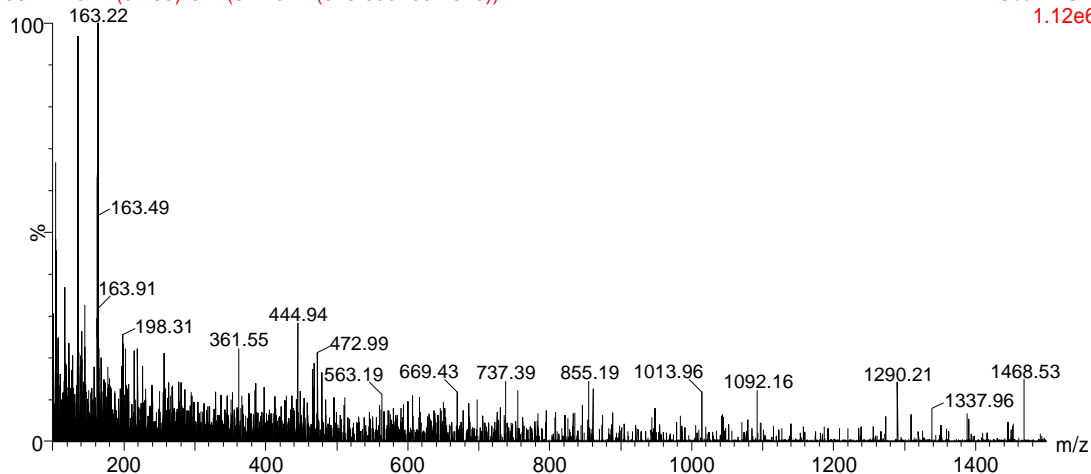


Рисунок 10 - Хроматограмма и строение кофейной кислоты.

ExDes-del2-1 Lavandulifolioside
 UP-010622-1 10675 (8.896) Cm (10633:10715-10785)

19:55:38 01-Jun-2022
 2: Diode Array
 6.615e-2

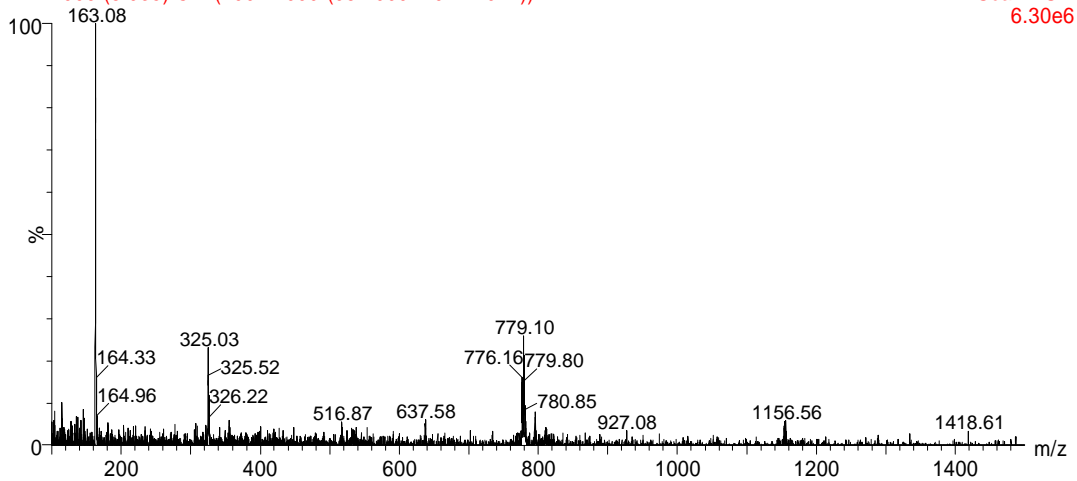
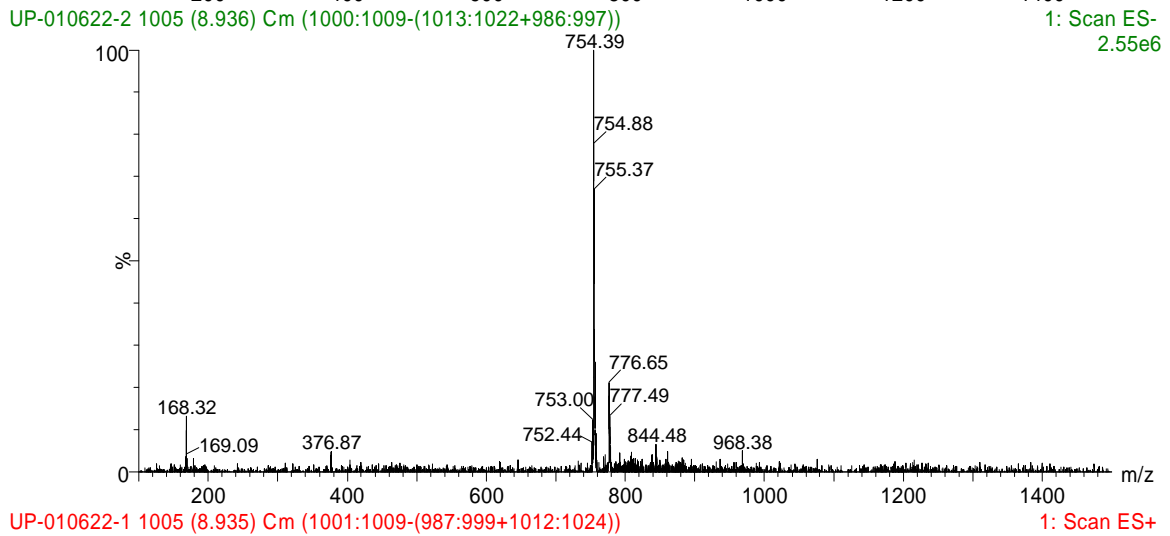
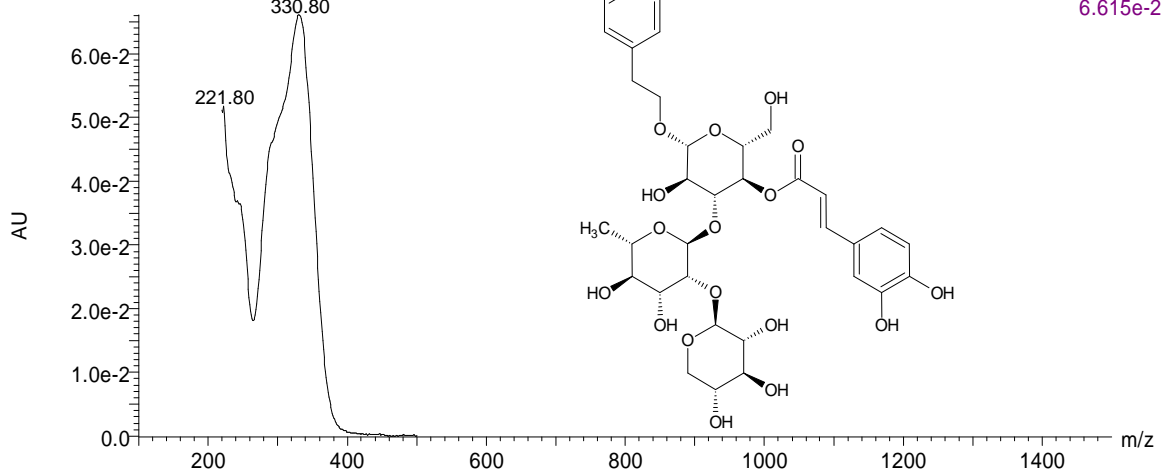
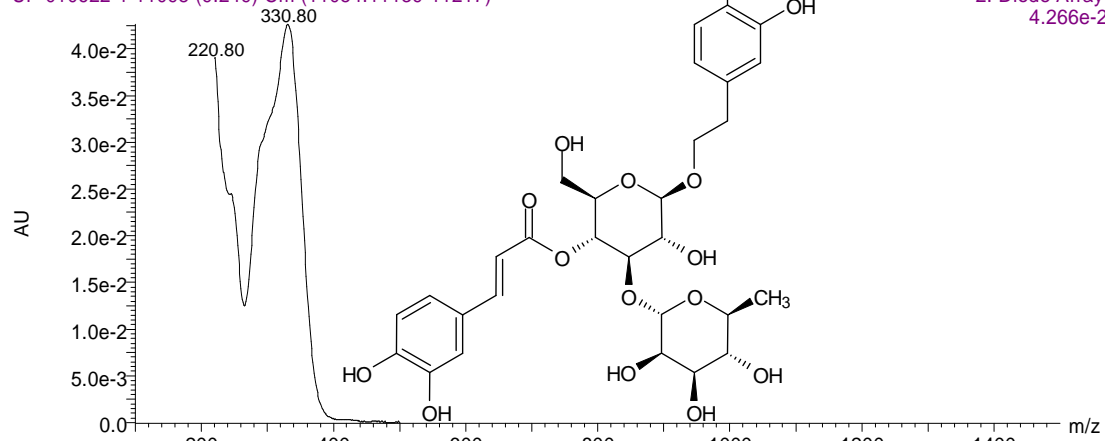


Рисунок 11 - Хроматограмма и строение лавандулифолиозида.

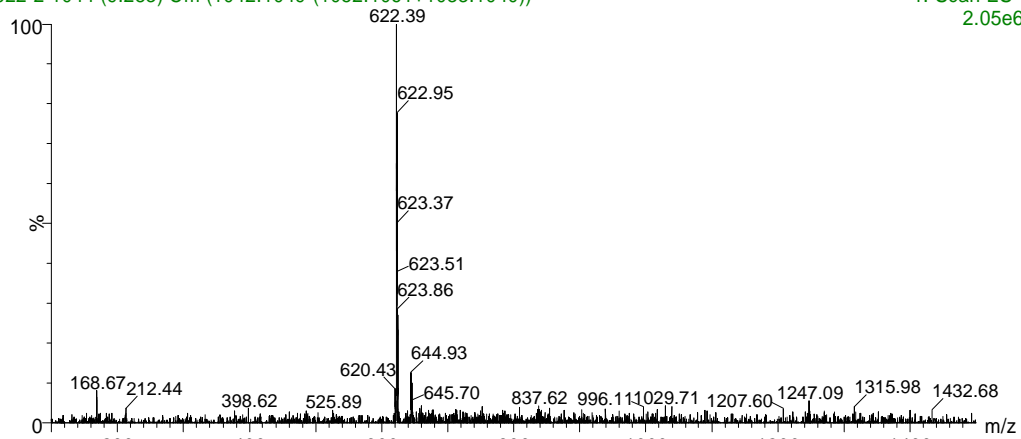
ExDes-del2-1 Verbascoside

UP-010622-1 11098 (9.249) Cm (11054:11139-11217)

19:55:38 01-Jun-2022

2: Diode Array
4.266e-2

UP-010622-2 1044 (9.283) Cm (1042:1049-(1052:1061+1033:1040))

1: Scan ES-
2.05e6

UP-010622-1 1045 (9.291) Cm (1041:1049-(1051:1060+1030:1038))

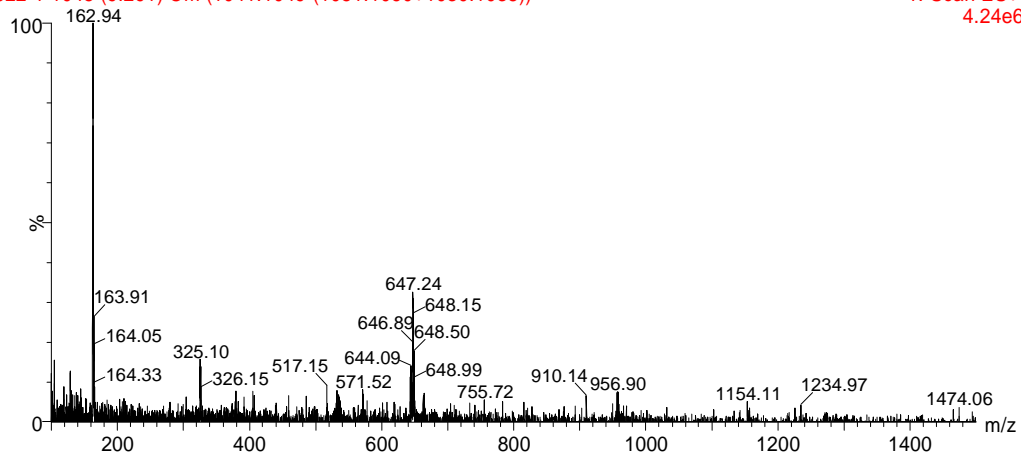
1: Scan ES+
4.24e6

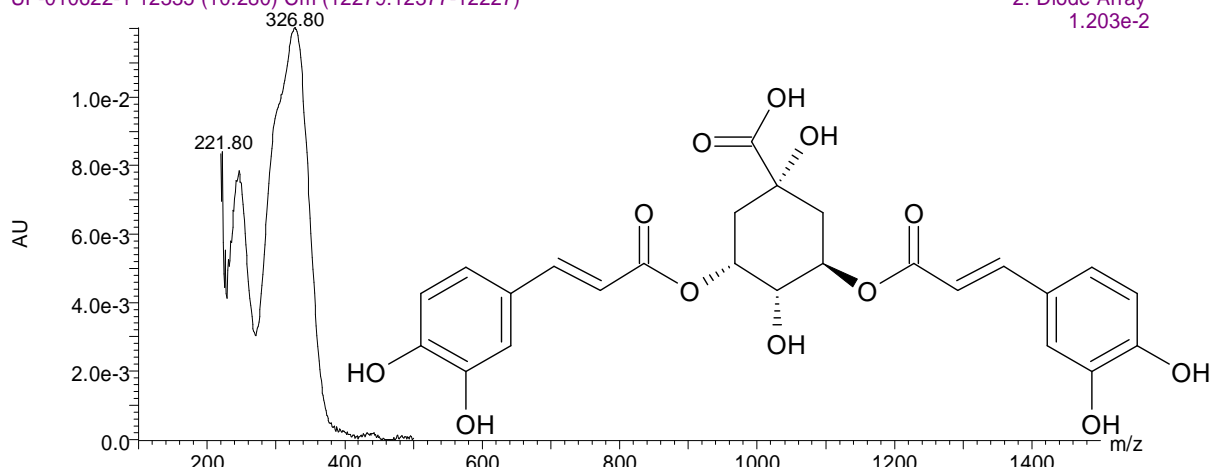
Рисунок 12 - Хроматограмма и строение вербаскозида.

ExDes-del2-1 3,5-O-Dicaffeoylquinic acid

19:55:38 01-Jun-2022

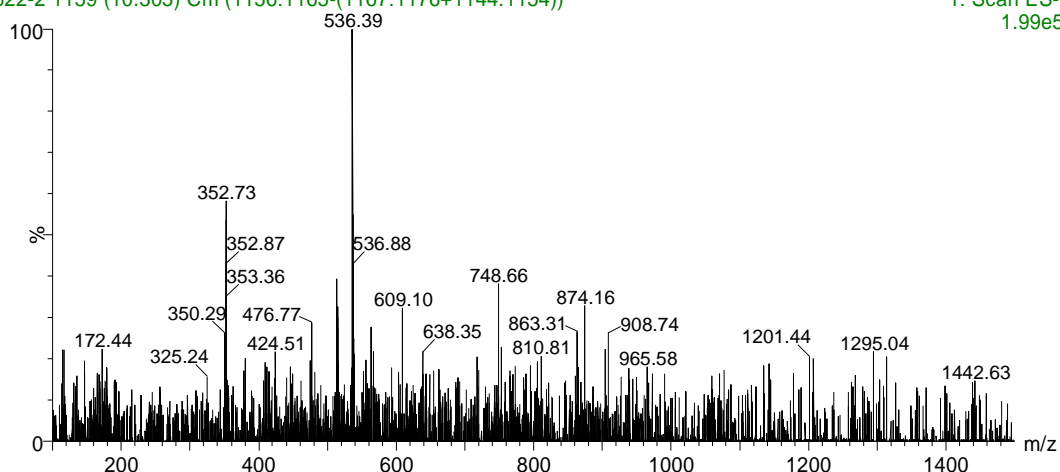
UP-010622-1 12335 (10.280) Cm (12279:12377-12227)

2: Diode Array
1.203e-2



UP-010622-2 1159 (10.305) Cm (1156:1165-(1167:1176+1144:1154))

1: Scan ES-
1.99e5



UP-010622-1 1163 (10.340) Cm (1156:1166-(1168:1181+1141:1155))

1: Scan ES+
1.03e6

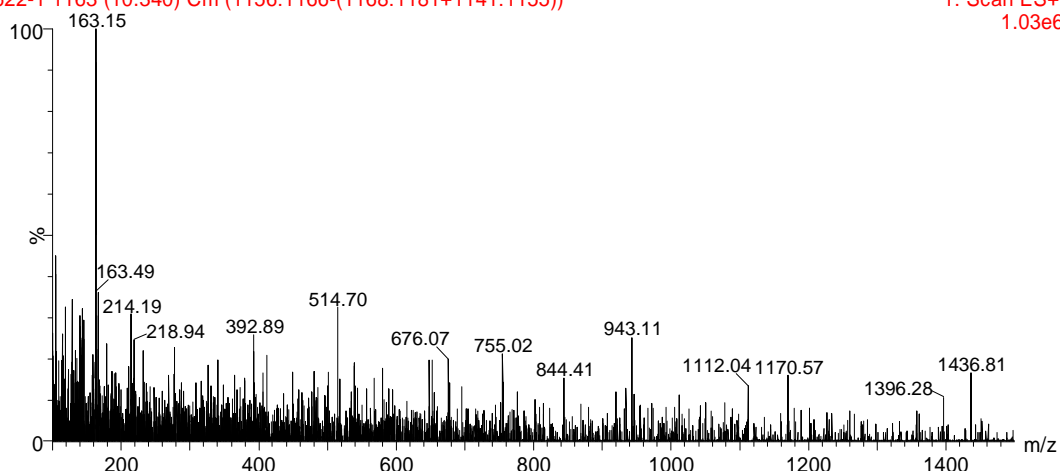
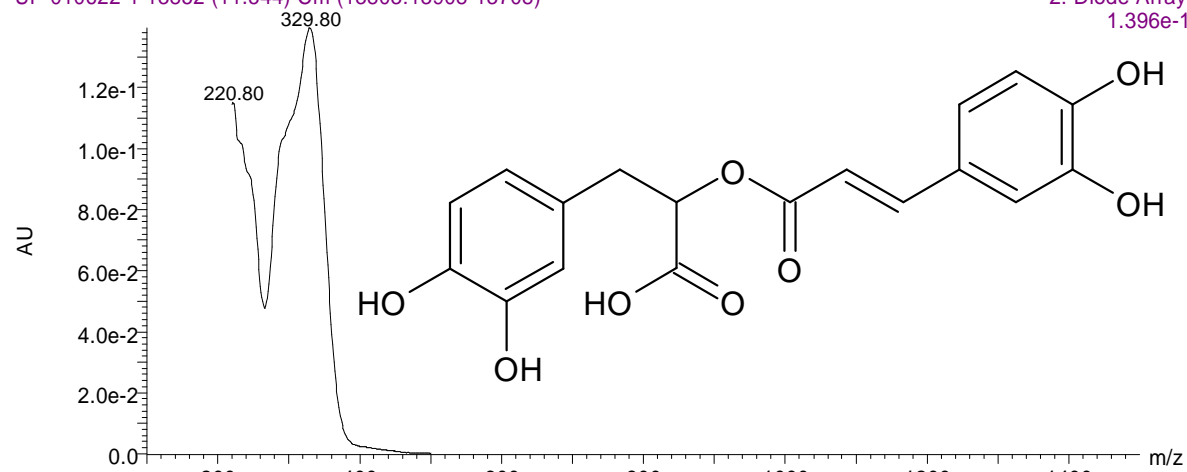


Рисунок 13 - Хроматограмма и строение производного кофейной кислоты.

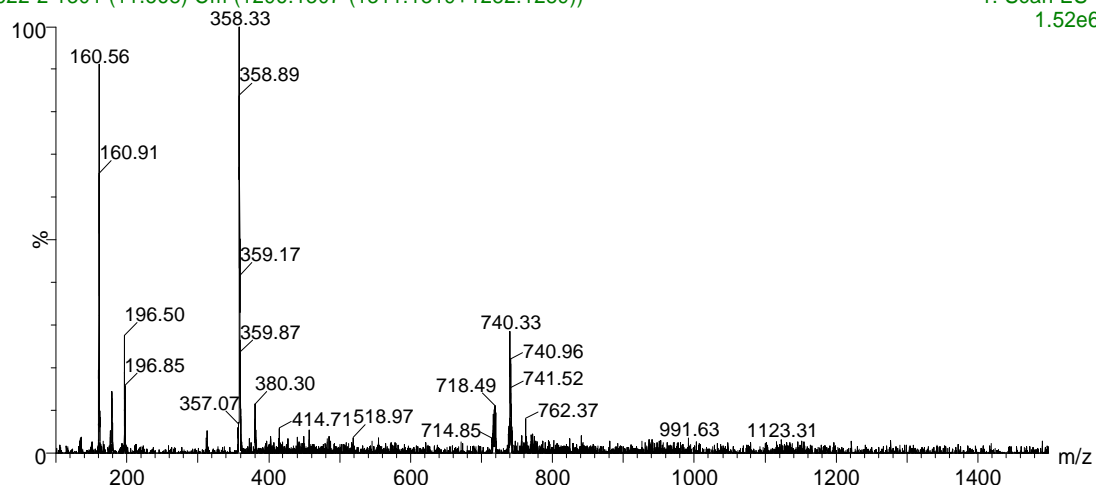
ExDes-del2-1 Rosmarinic acid

UP-010622-1 13852 (11.544) Cm (13803:13908-13708)

19:55:38 01-Jun-2022

2: Diode Array
1.396e-1

UP-010622-2 1301 (11.568) Cm (1296:1307-(1311:1319+1282:1289))

1: Scan ES-
1.52e6

UP-010622-1 1302 (11.576) Cm (1297:1310-(1312:1335+1276:1292))

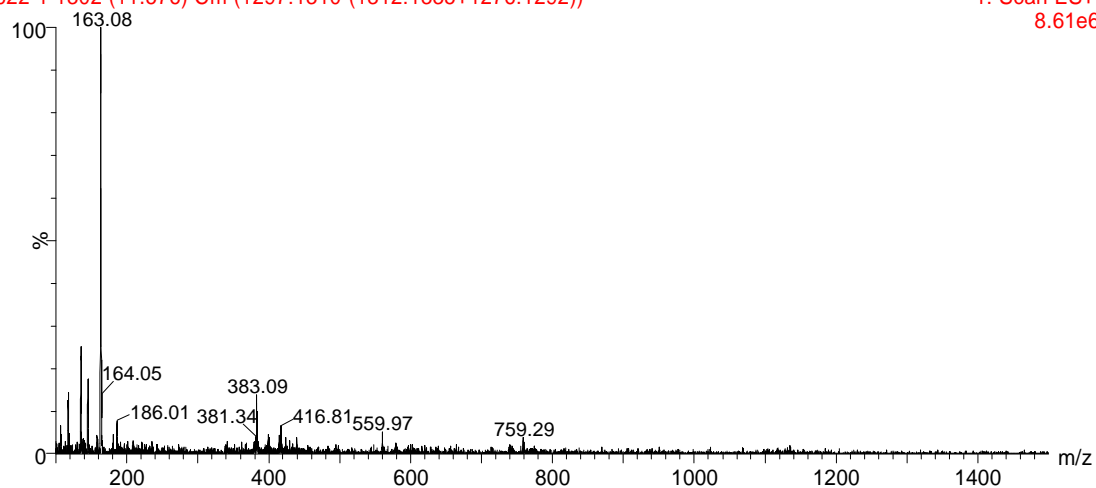
1: Scan ES+
8.61e6

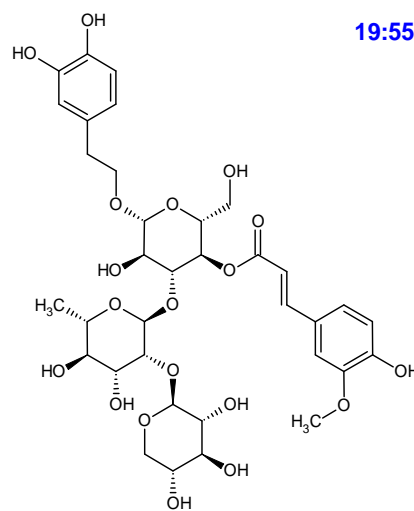
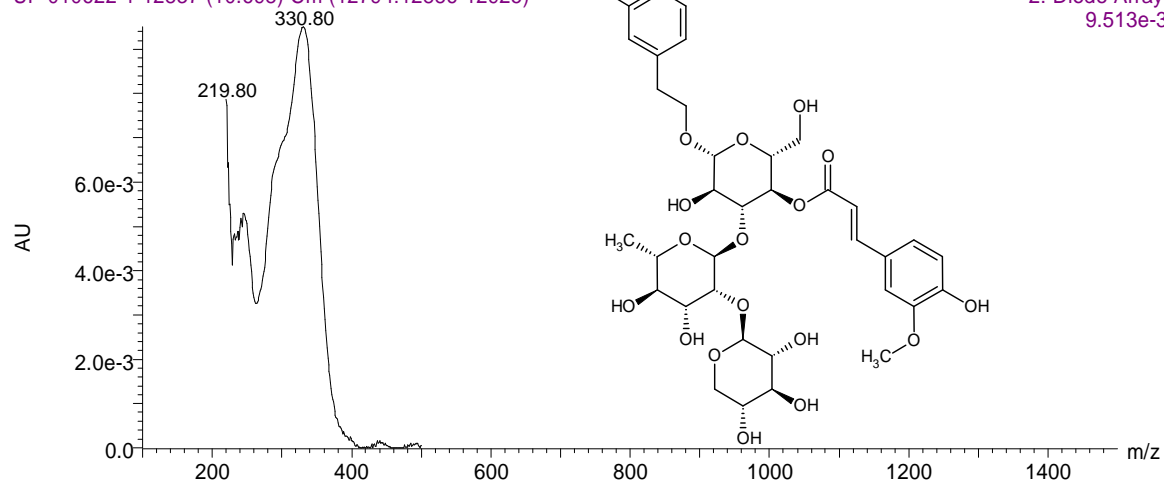
Рисунок 14 - Хроматограмма и строение розмариновой кислоты.

ExDes-del2-1 Leonoside A

UP-010622-1 12837 (10.698) Cm (12794:12886-12925)

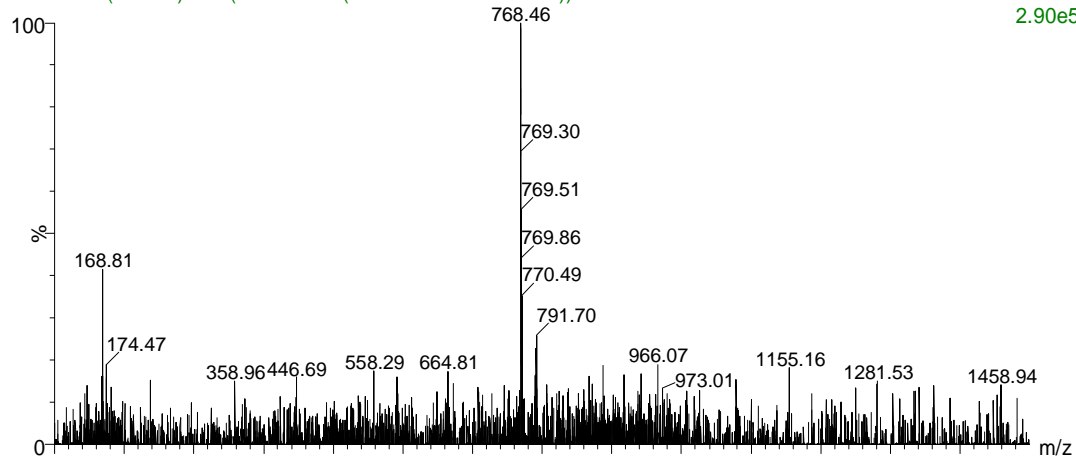
19:55:38 01-Jun-2022

2: Diode Array
9.513e-3



UP-010622-2 1207 (10.732) Cm (1202:1212-(1213:1227+1191:1201))

1: Scan ES-
2.90e5



UP-010622-1 1207 (10.731) Cm (1202:1211-(1213:1226+1194:1201))

1: Scan ES+
1.22e6

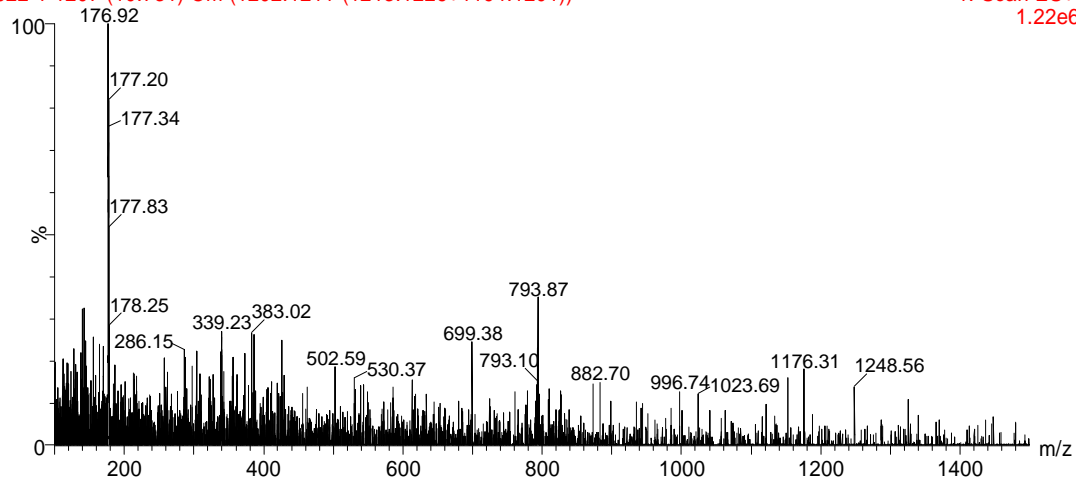


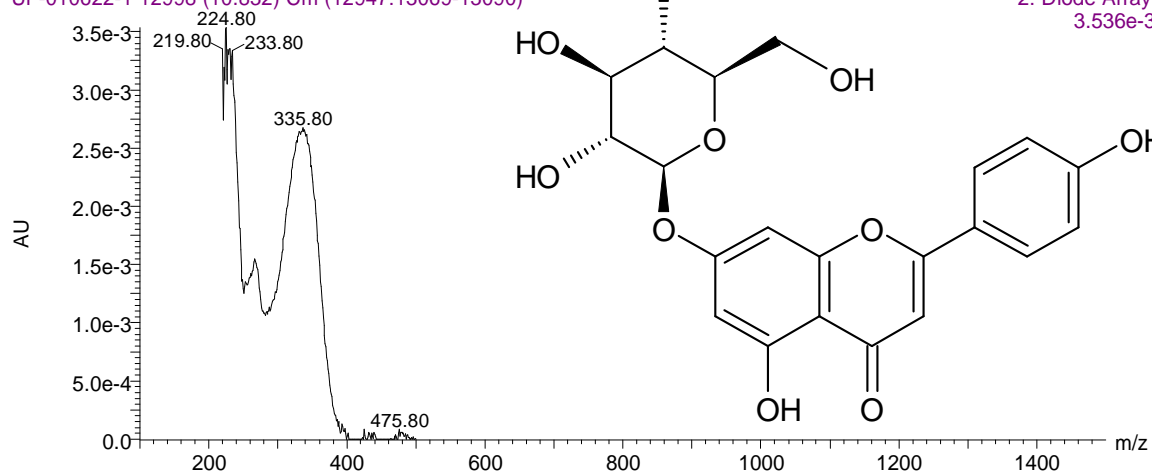
Рисунок 15 - Хроматограмма и строение леонозида А.

ExDes-del2-1 Apigenin-7-Glucoside

UP-010622-1 12998 (10.832) Cm (12947:13069-13090)

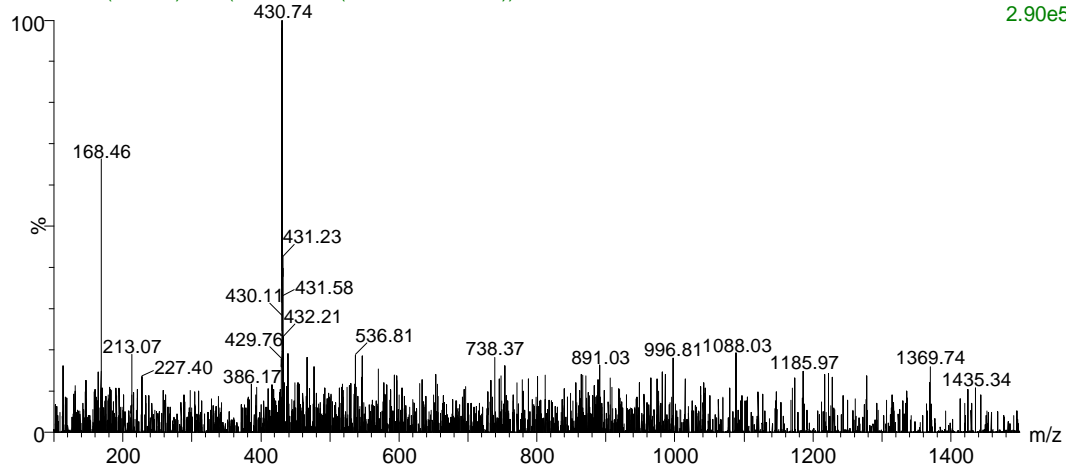
19:55:38 01-Jun-2022

2: Diode Array
3.536e-3



UP-010622-2 1222 (10.866) Cm (1218:1227-(1207:1216+1231))

1: Scan ES-
2.90e5



UP-010622-1 1225 (10.891) Cm (1219:1228-(1231:1247+1195:1214))

1: Scan ES+
5.46e5

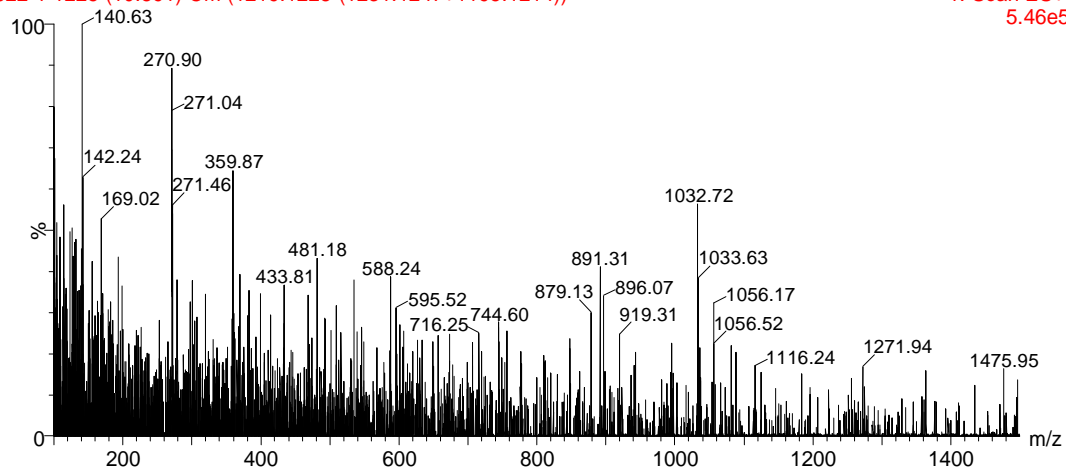


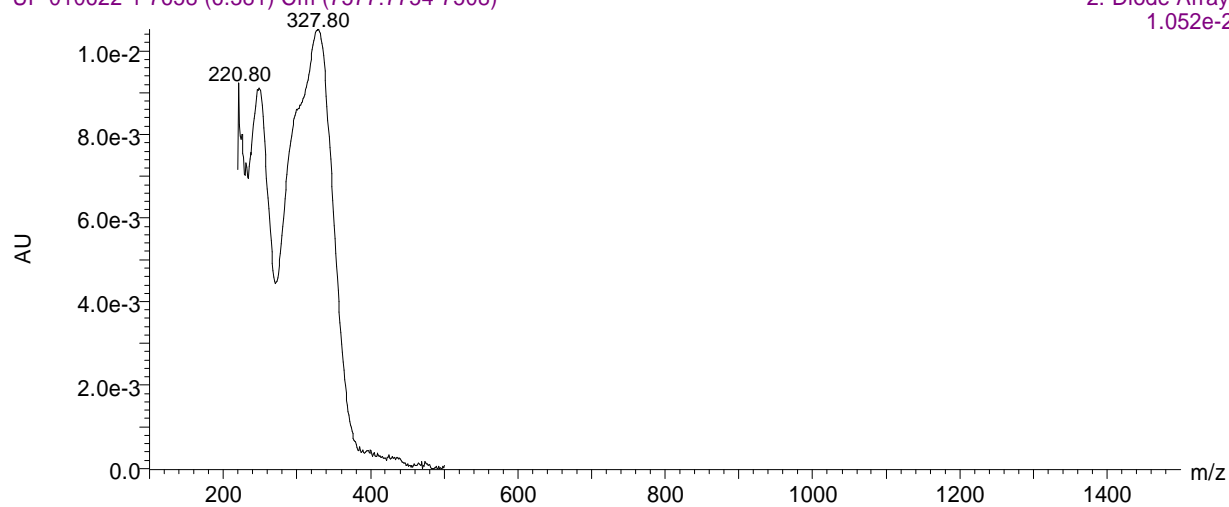
Рисунок 16 - Хроматограмма и строение апигенин-7-глюкозида.

Рисунки 17 – 21 – Вещества с точно не установленной структурой:

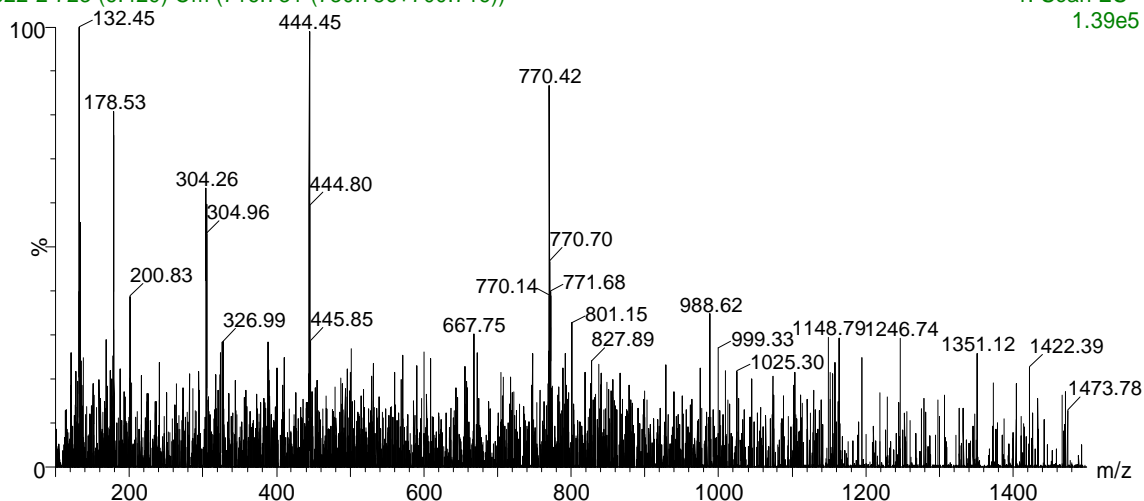
ExDes-del2-1 Caffeic Acid-328nm-446m

19:55:38 01-Jun-2022

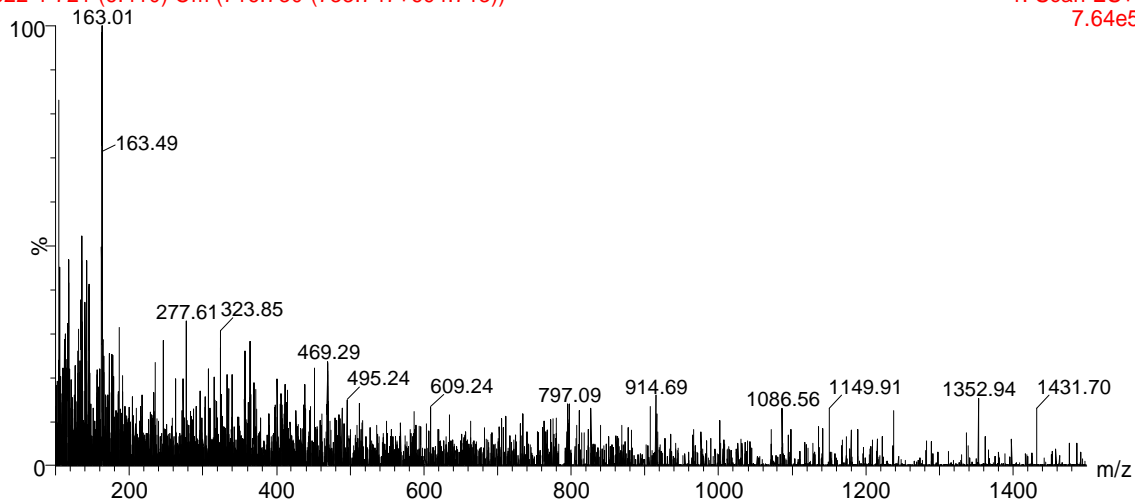
UP-010622-1 7658 (6.381) Cm (7577:7754-7508)

2: Diode Array
1.052e-2

UP-010622-2 723 (6.429) Cm (716:731-(730:756+700:716))

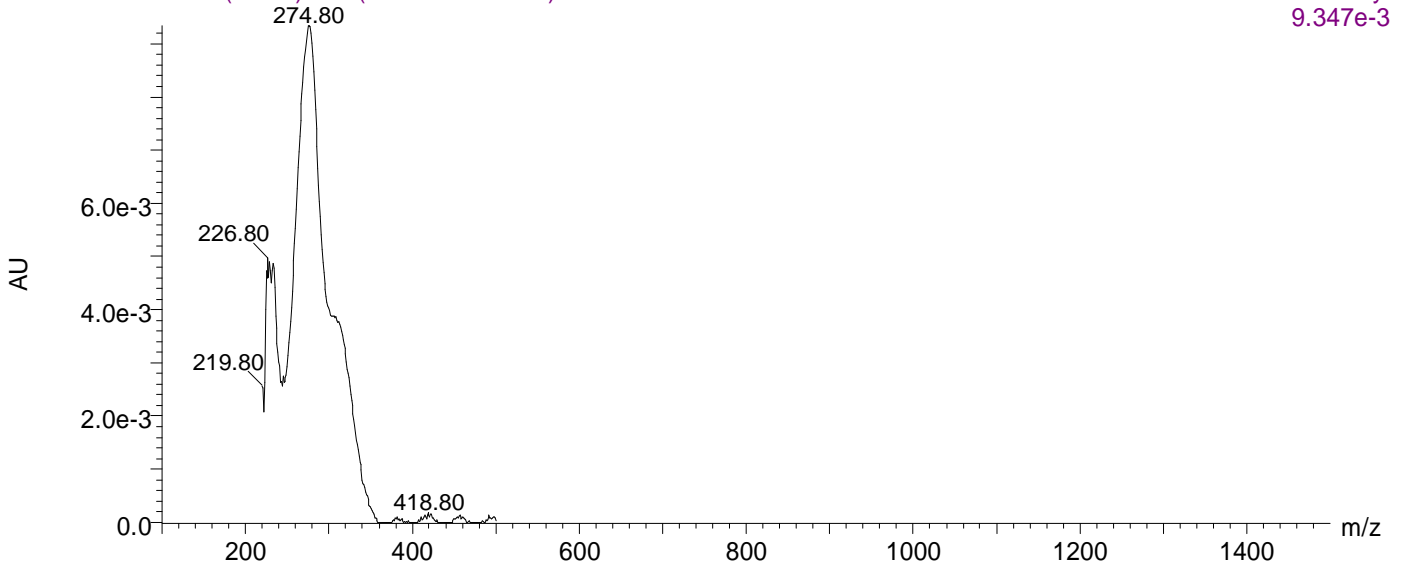
1: Scan ES-
1.39e5

UP-010622-1 721 (6.410) Cm (716:730-(733:747+694:713))

1: Scan ES+
7.64e5

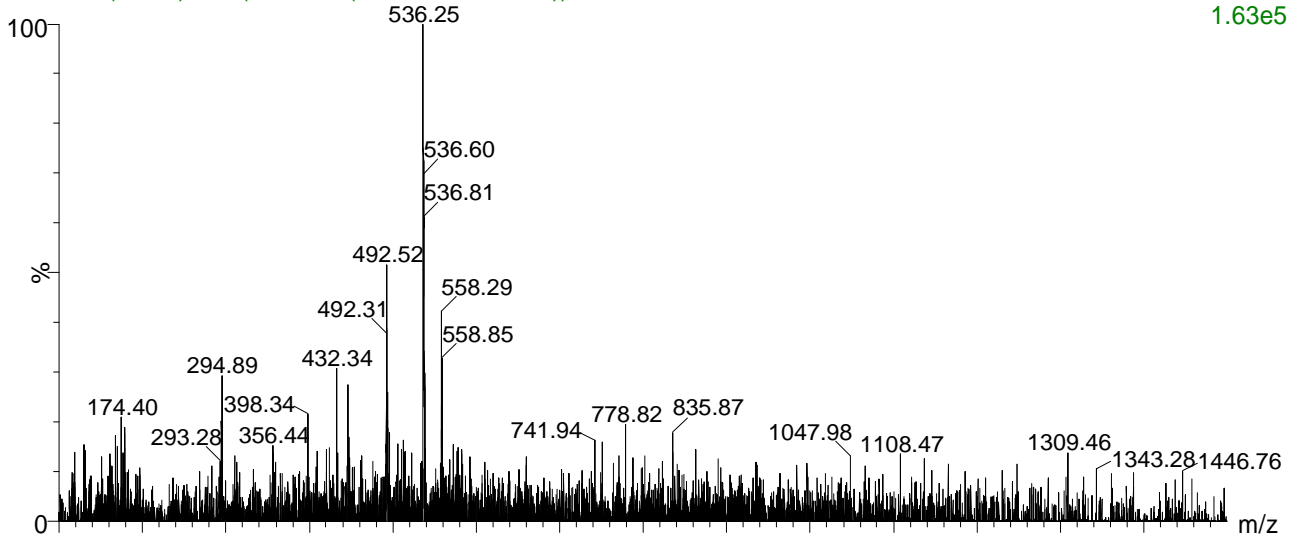
ExDes-del2-1 X-275nm-538m
UP-010622-1 9088 (7.573) Cm (8928:9190-9326)

19:55:38 01-Jun-2022
2: Diode Array
9.347e-3



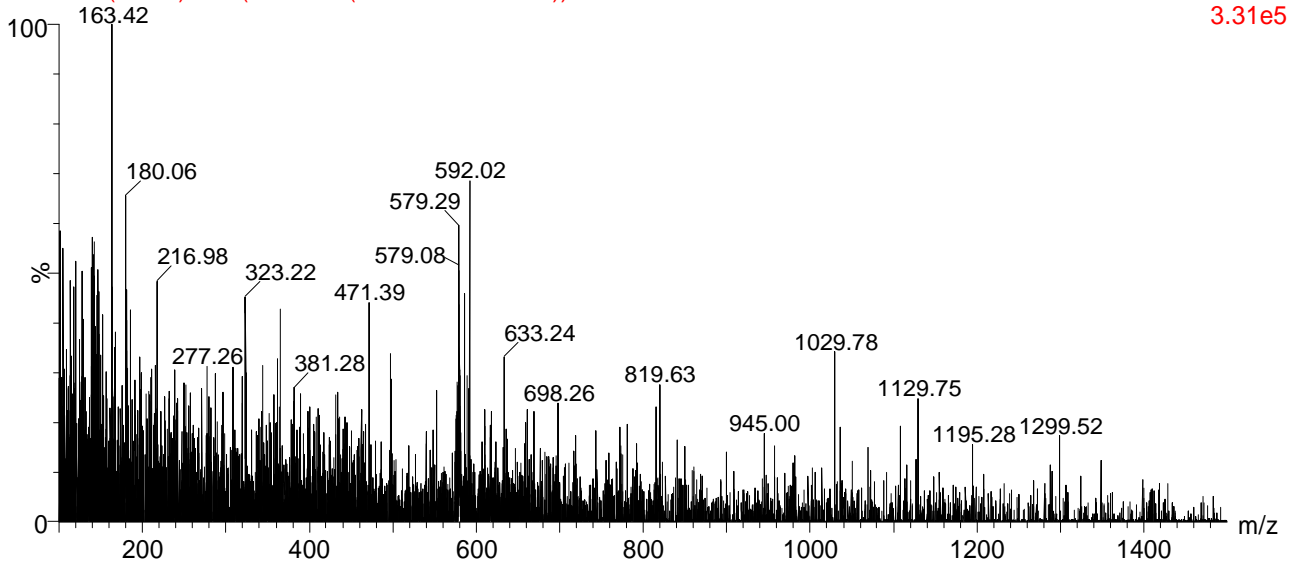
UP-010622-2 848 (7.540) Cm (839:871-(886:922+780:827))

1: Scan ES-
1.63e5



UP-010622-1 856 (7.610) Cm (840:868-(872:911+781:835))

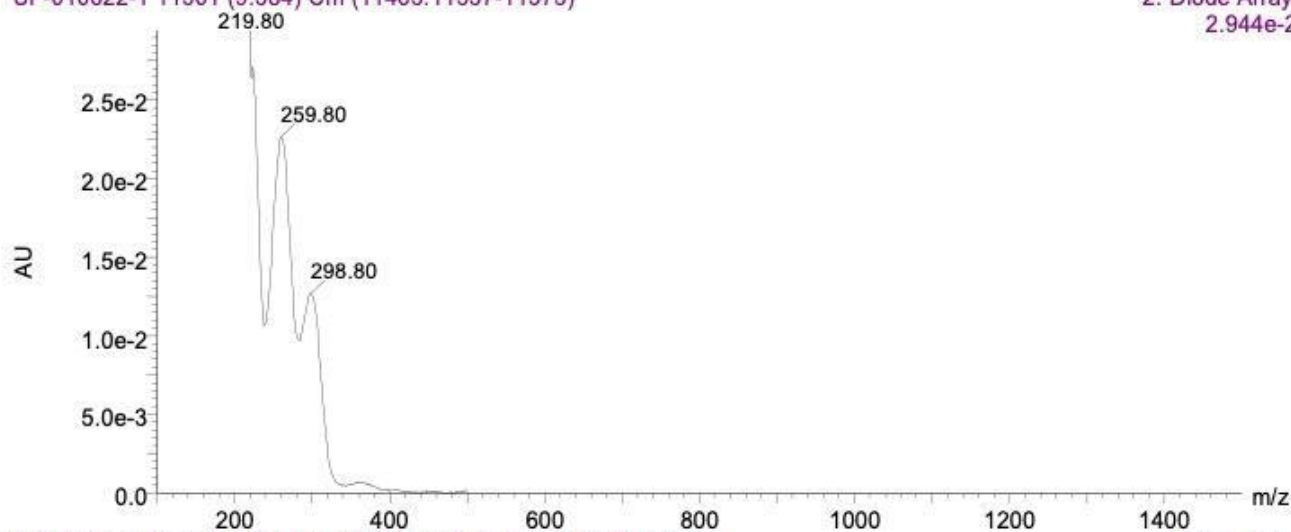
1: Scan ES+
3.31e5



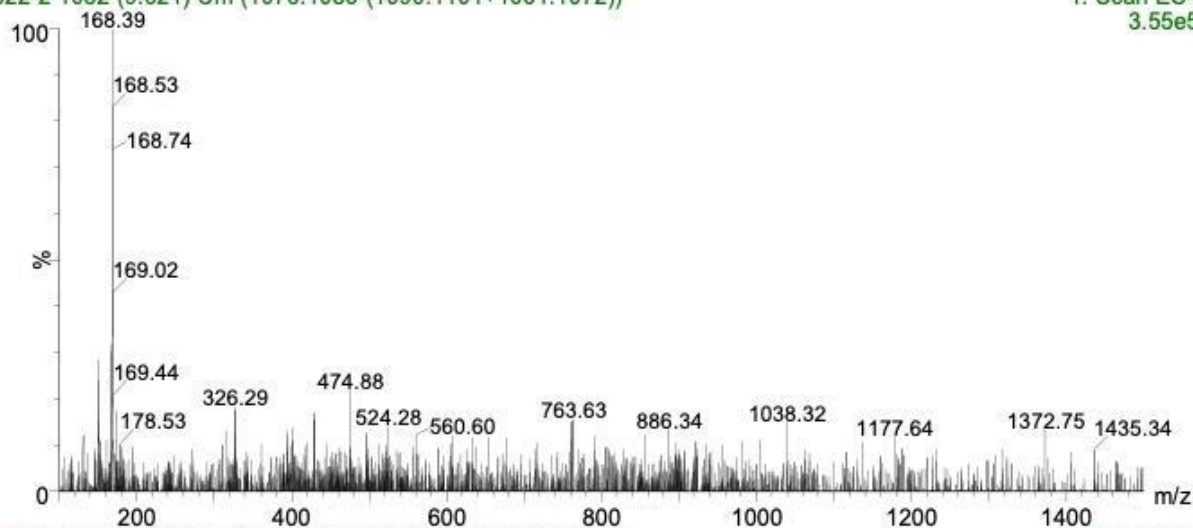
ExDes-del2-1 X-299nm-170m

UP-010622-1 11501 (9.584) Cm (11463:11537-11373)

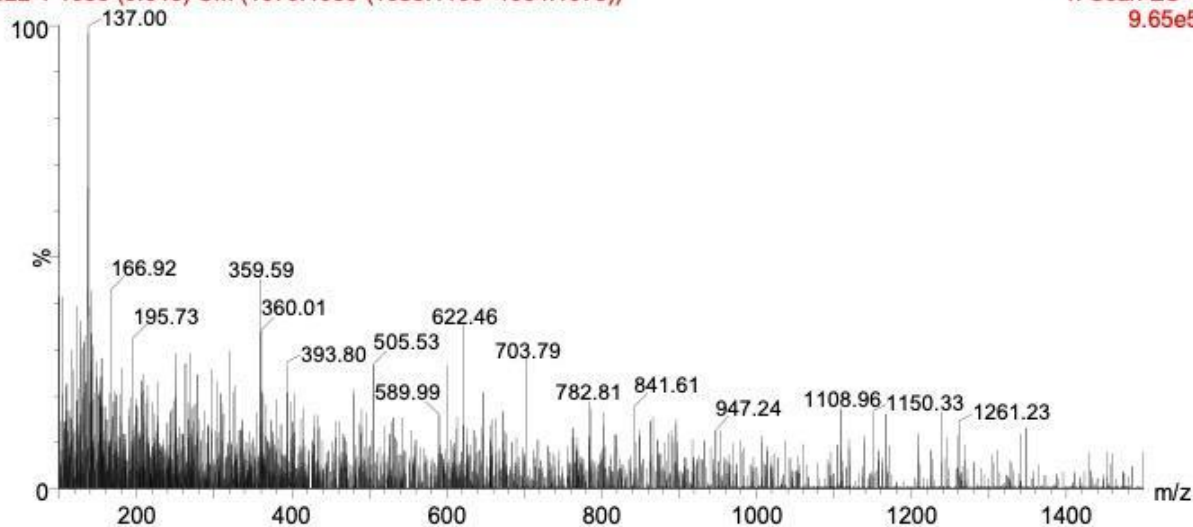
19:55:38 01-Jun-2022

2: Diode Array
2.944e-2

UP-010622-2 1082 (9.621) Cm (1076:1086-(1090:1101+1061:1072))

1: Scan ES-
3.55e5

UP-010622-1 1085 (9.646) Cm (1079:1086-(1088:1100+1054:1078))

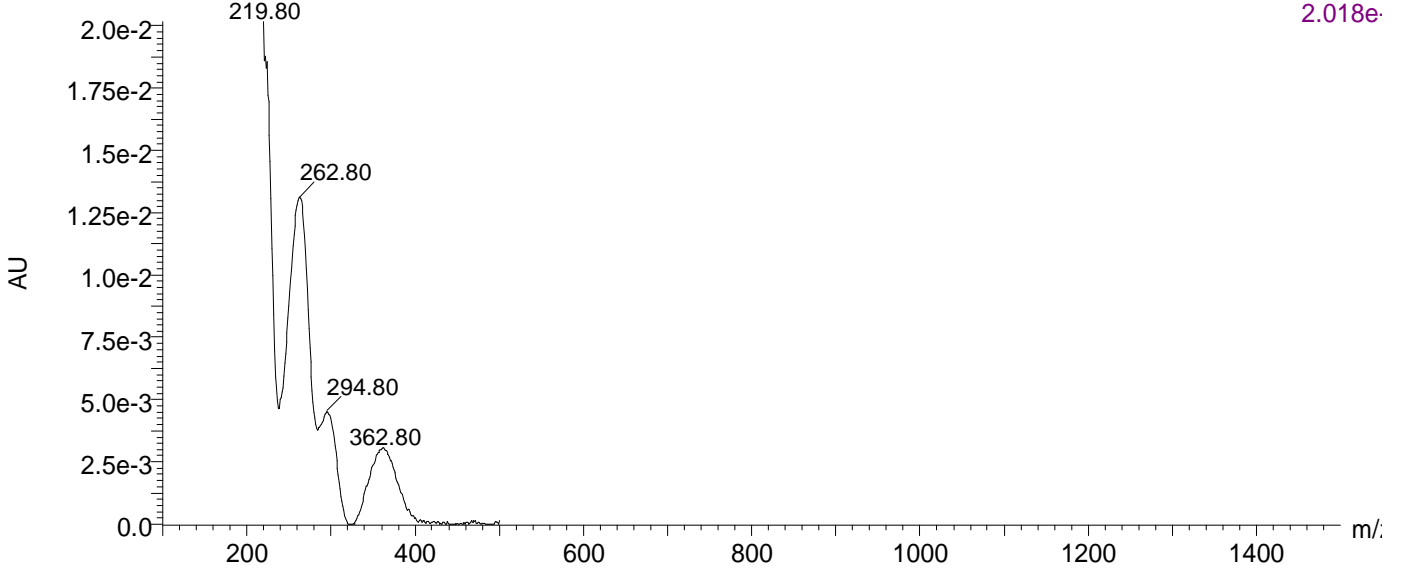
1: Scan ES+
9.65e5

ExDes-del2-1 X-Kaempferol-336nm-422m

19:55:38 01-Jun-202

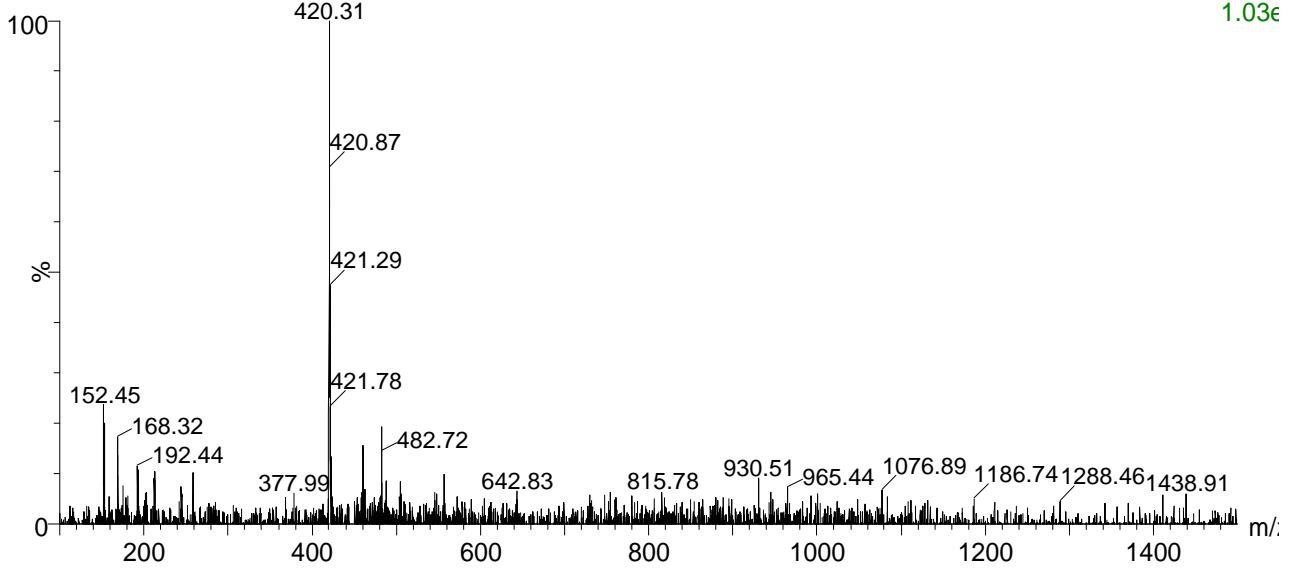
UP-010622-1 10984 (9.154) Cm (10949:11016-11045)

2: Diode Arra
2.018e



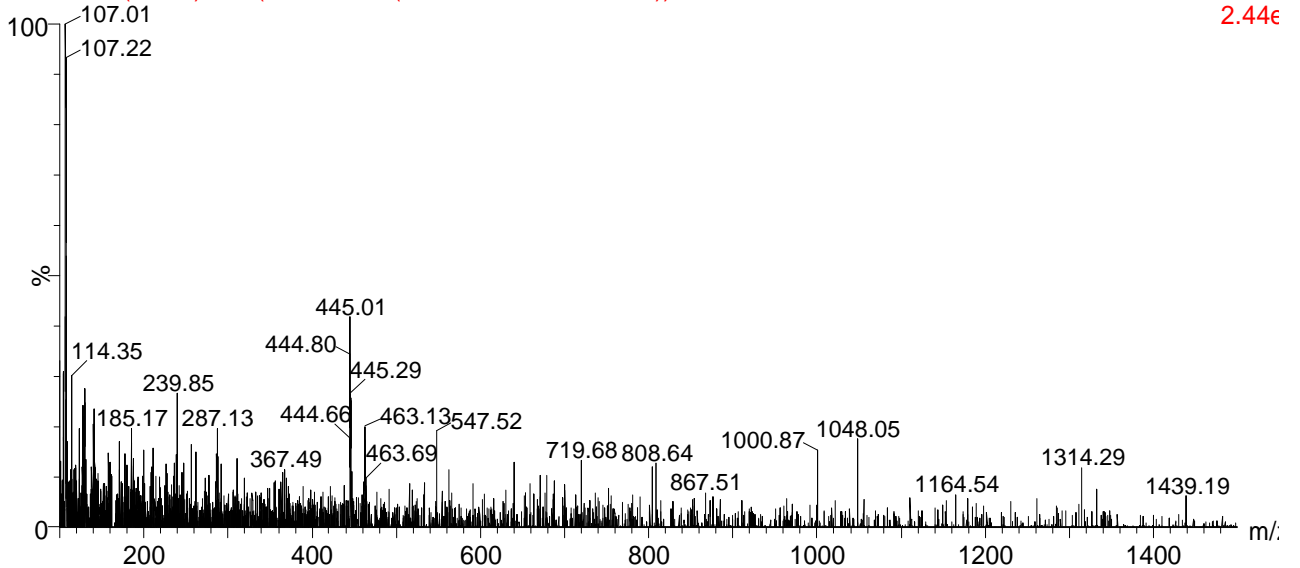
UP-010622-2 1032 (9.176) Cm (1031:1037-(1038:1044+1022:1031))

1: Scan ES
1.03e



UP-010622-1 1034 (9.193) Cm (1032:1037-(1040:1047+1026:1030))

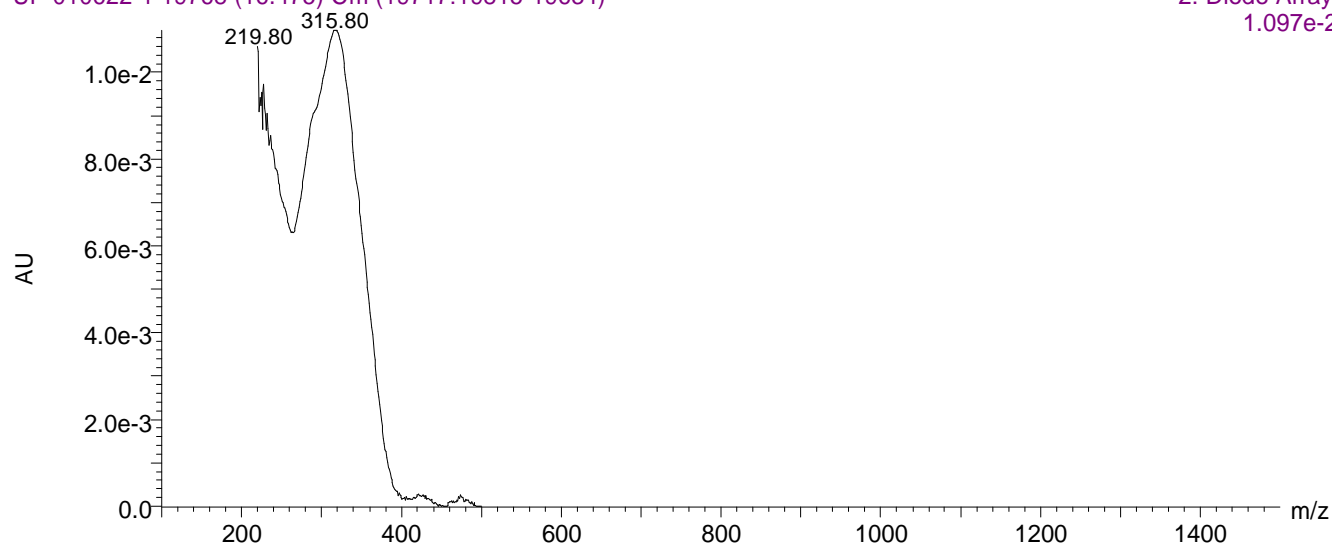
1: Scan ES
2.44e



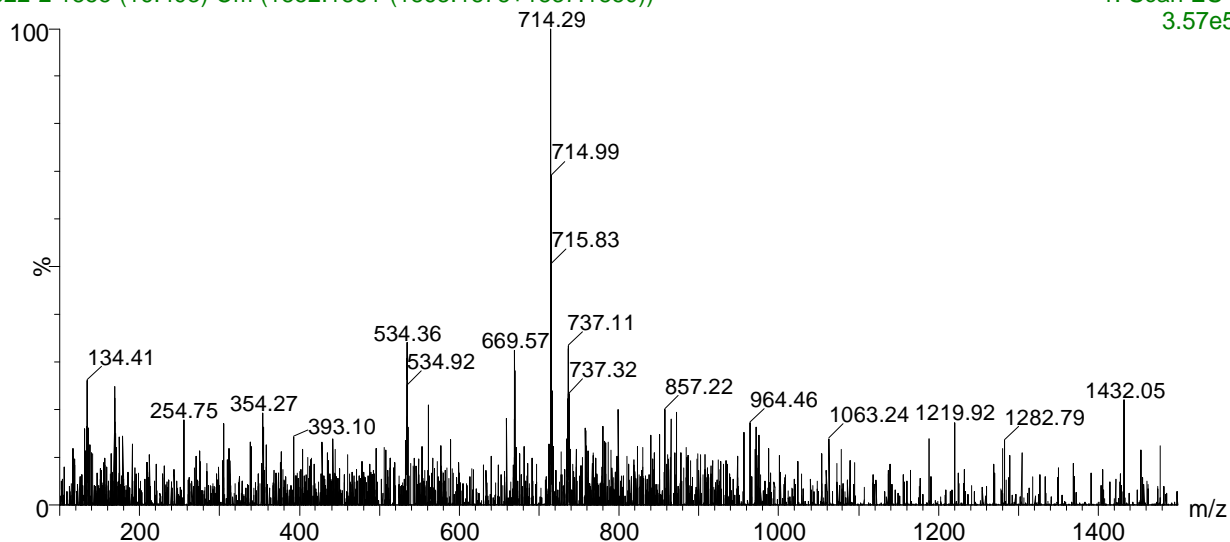
ExDes-del2-1 X-316nm-716m

UP-010622-1 19768 (16.475) Cm (19717:19815-19634)

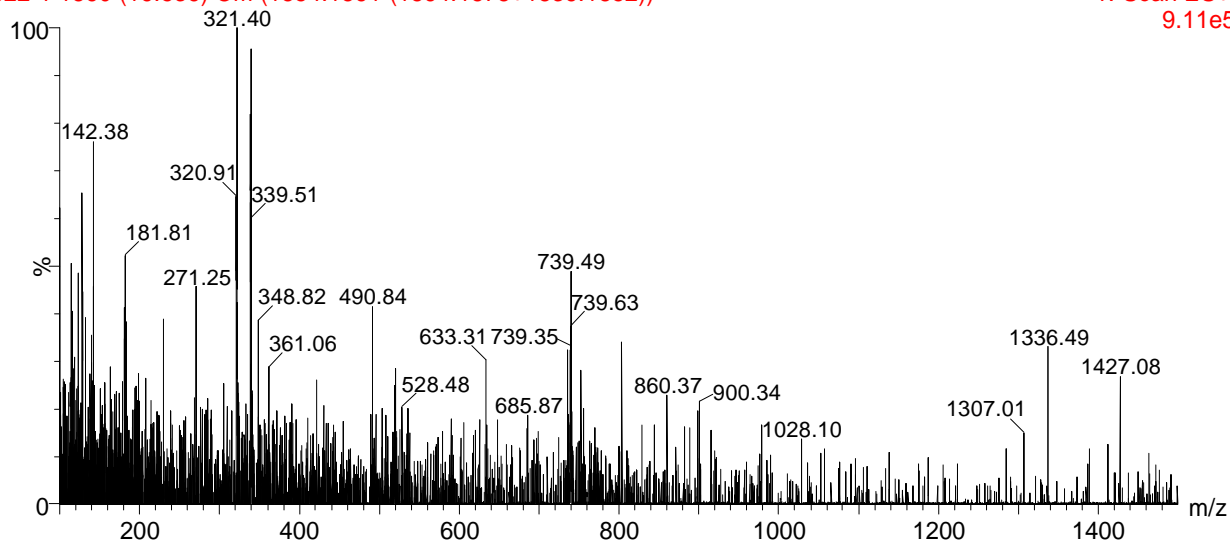
19:55:38 01-Jun-2022

2: Diode Array
1.097e-2

UP-010622-2 1855 (16.493) Cm (1852:1861-(1863:1878+1837:1850))

1: Scan ES-
3.57e5

UP-010622-1 1860 (16.536) Cm (1854:1861-(1864:1878+1836:1852))

1: Scan ES+
9.11e5

УЭЖХ-ХРОМАТОГРАММЫ, МАСС-СПЕКТРЫ СОЕДИНЕНИИ, ЭКСТРАГИРУЕМЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ 70%-ОГО ЭТИЛОВОГО СПИРТА В КАЧЕСТВЕ ЭКСТРАГЕНТА

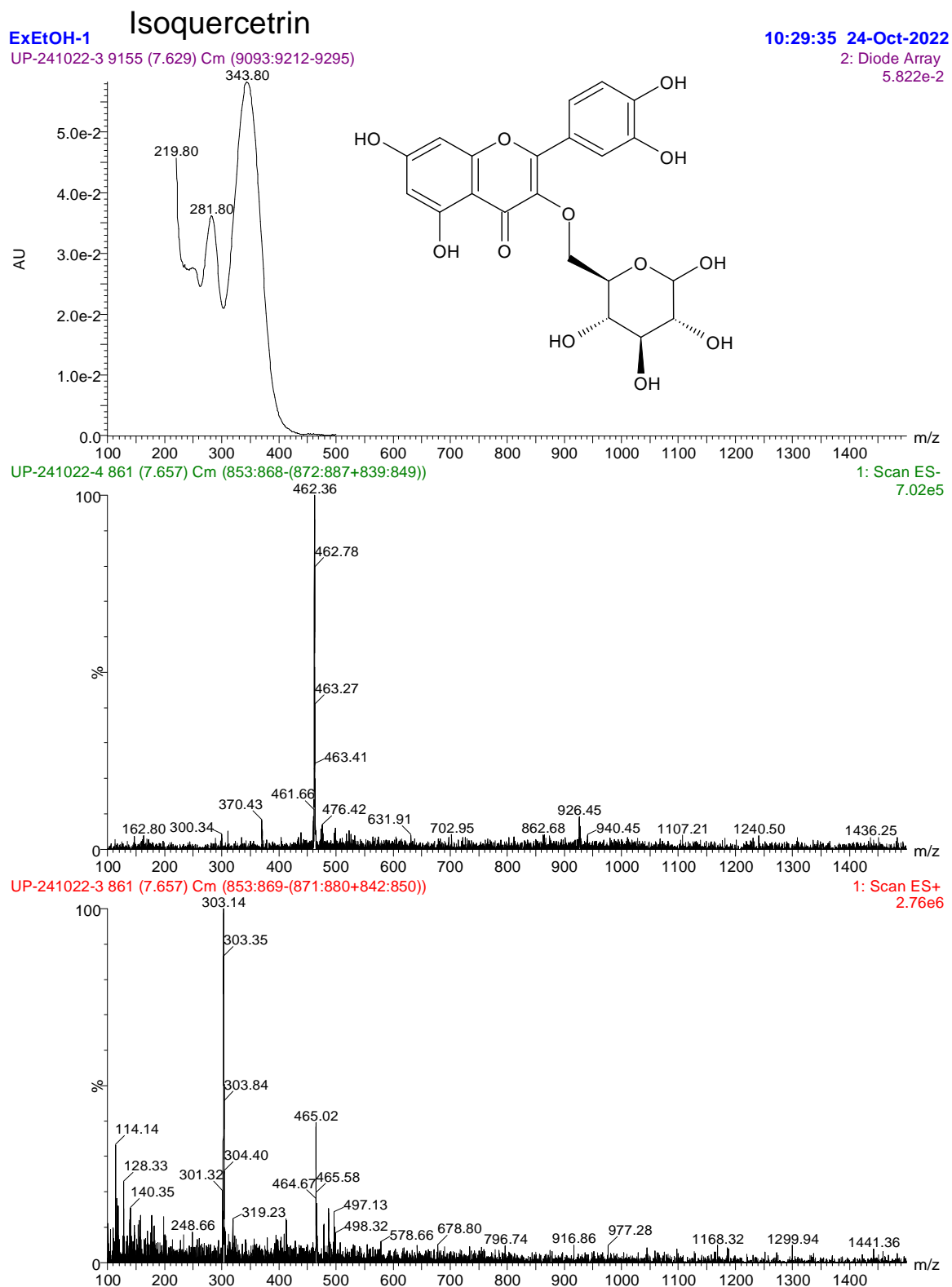


Рисунок 1 - Хроматограмма и строение изокверцетина.

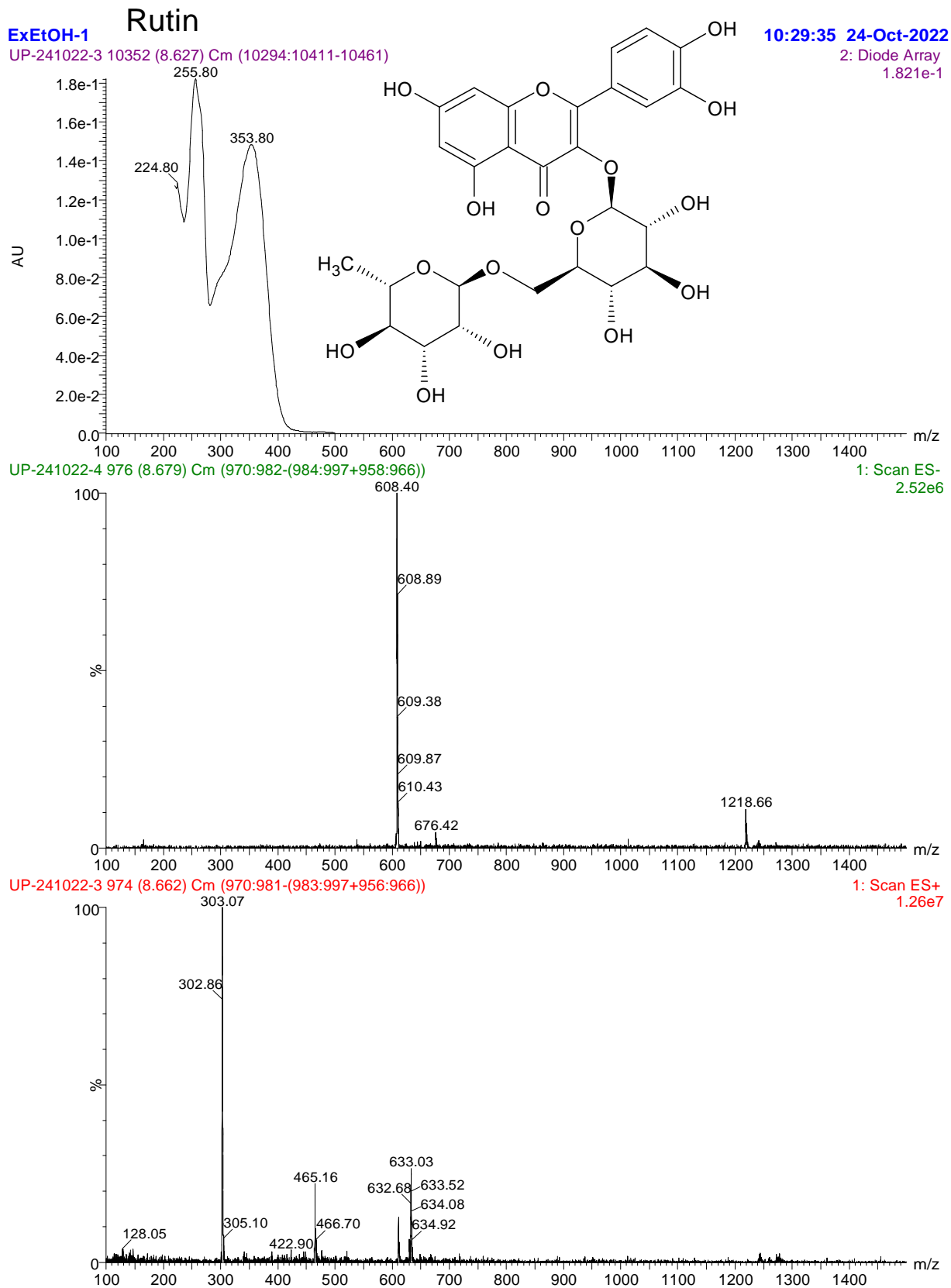
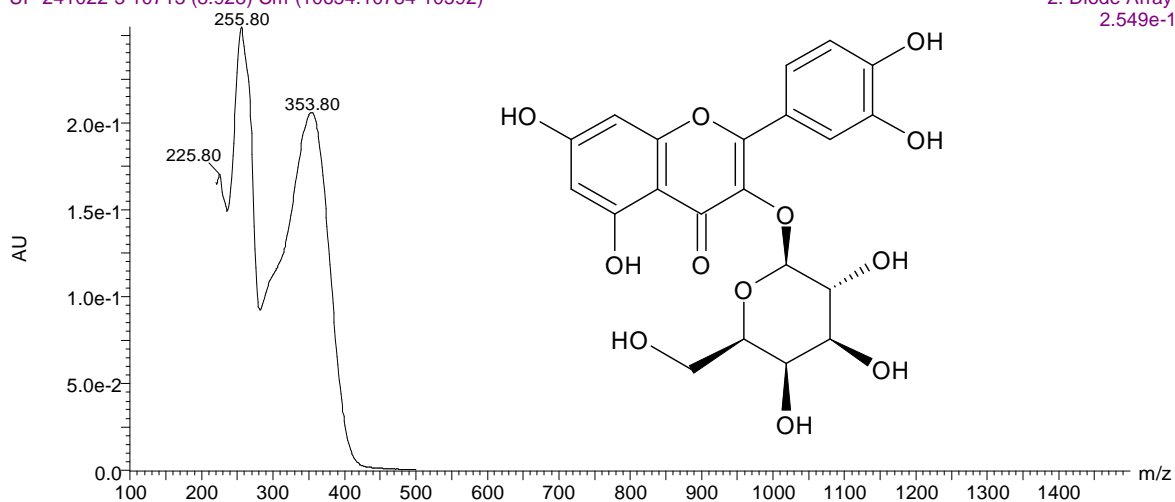


Рисунок 2 - Хроматограмма и строение рутина.

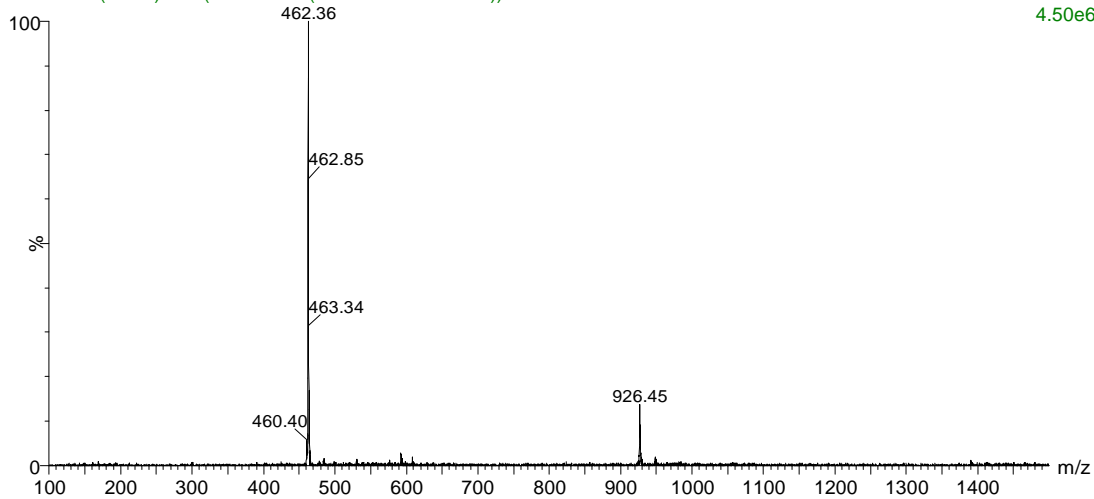
ExEtOH-1 Quercetin-3-Galactoside

10:29:35 24-Oct-2022

UP-241022-3 10713 (8.928) Cm (10654:10784-10592)

2: Diode Array
2.549e-1

UP-241022-4 1008 (8.964) Cm (1004:1019-(1020:1025+988:996))

1: Scan ES-
4.50e6

UP-241022-3 1009 (8.973) Cm (1002:1016-(1021:1026+991:998))

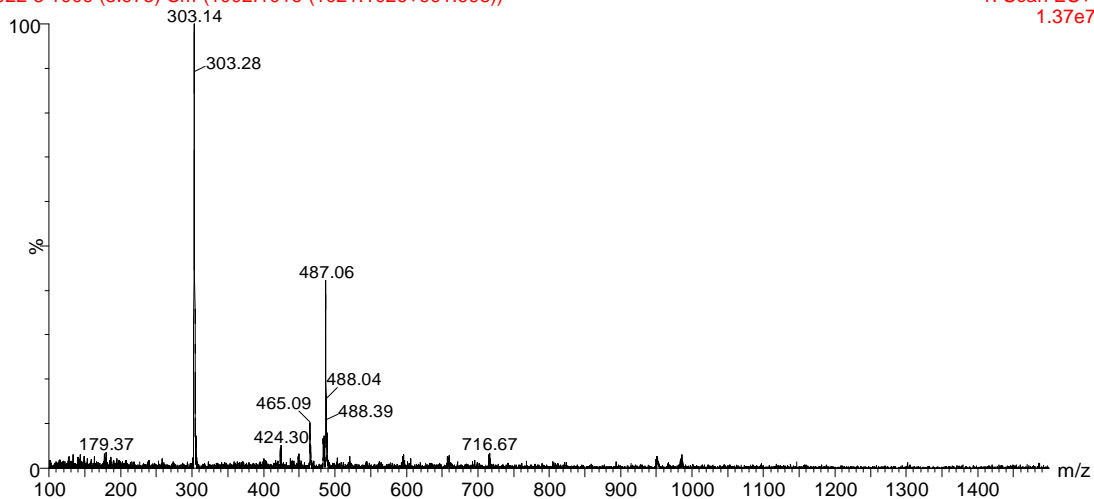
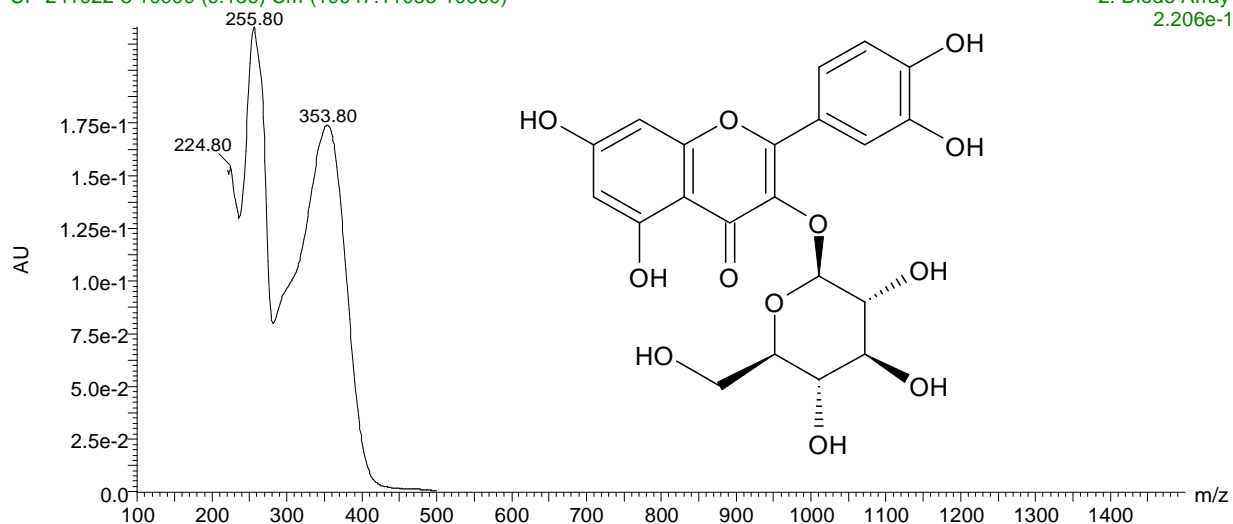
1: Scan ES+
1.37e7

Рисунок 3 - Хроматограмма и строение гиперозида.

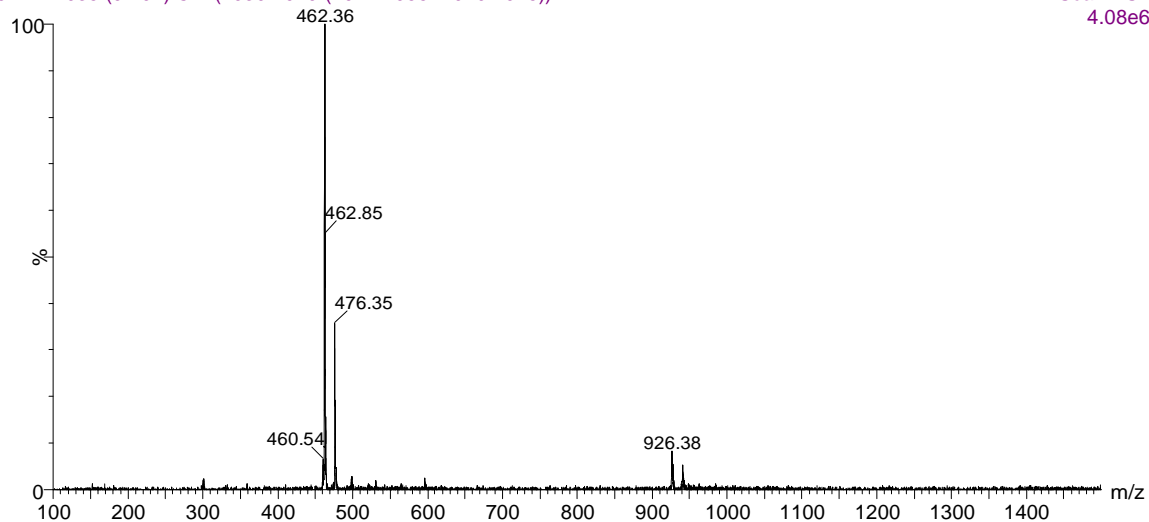
ExEtOH-1 Quercetin-3-Glucoside

10:29:35 24-Oct-2022

UP-241022-3 10990 (9.159) Cm (10947:11033-10860)

2: Diode Array
2.206e-1

UP-241022-4 1035 (9.204) Cm (1030:1040-(1042:1056+1020:1026))

1: Scan ES-
4.08e6

UP-241022-3 1034 (9.196) Cm (1029:1043-(1045:1060+1020:1026))

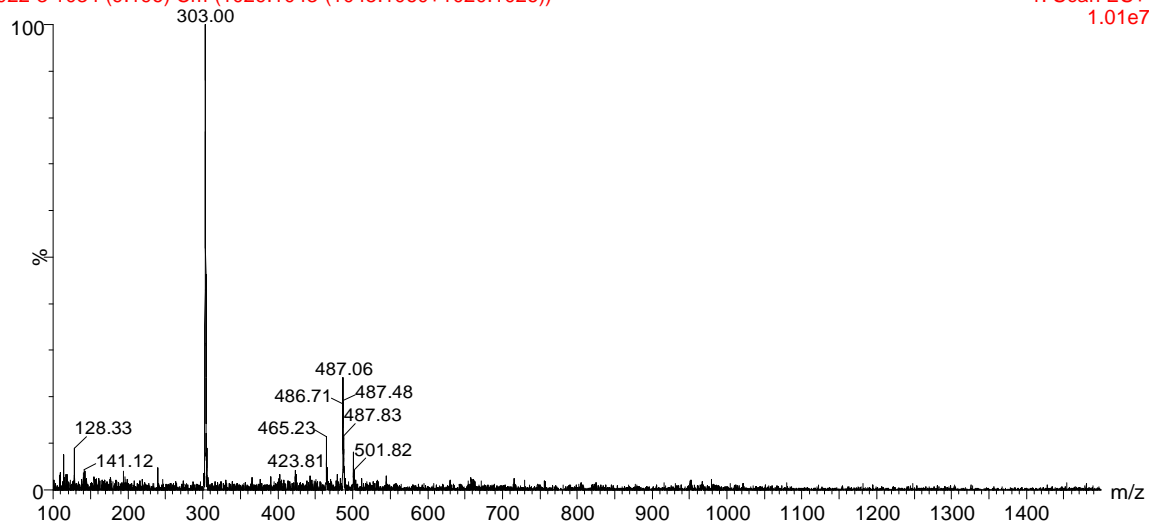
1: Scan ES+
1.01e7

Рисунок 4 - Хроматограмма и строение кверцетин-3-глюкозида.

ExEtOH-1 Quercetin 3,7-Dirhamnoside

10:29:35 24-Oct-2022

UP-241022-3 12056 (10.047) Cm (11991:12174-12211)

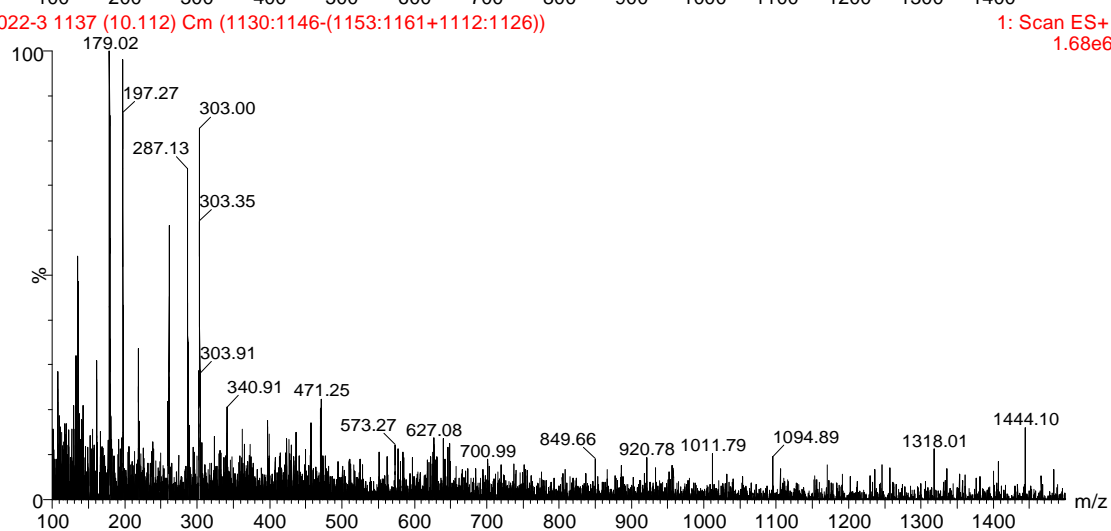
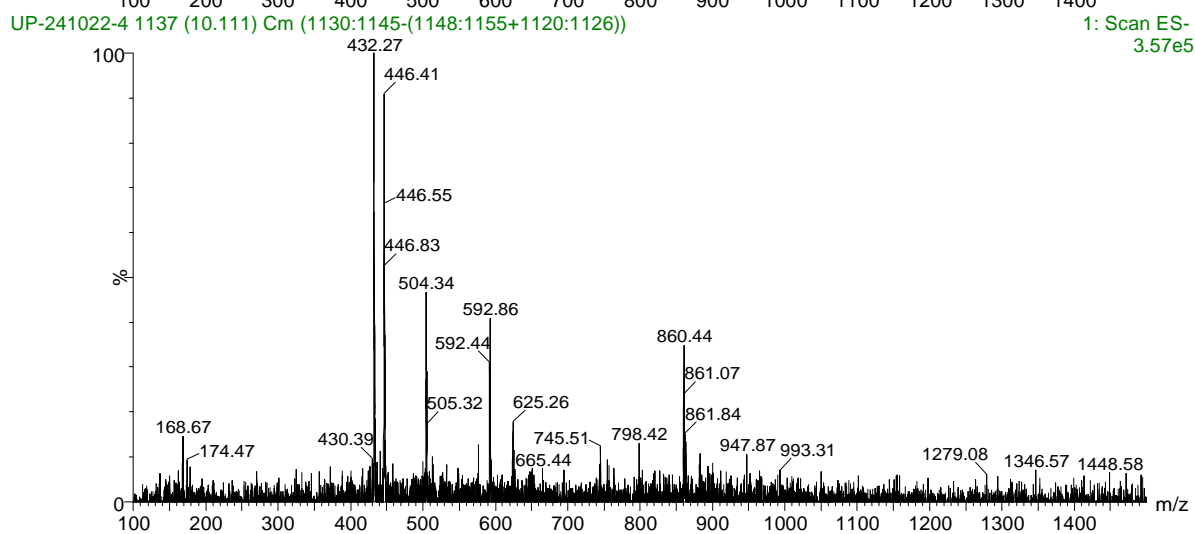
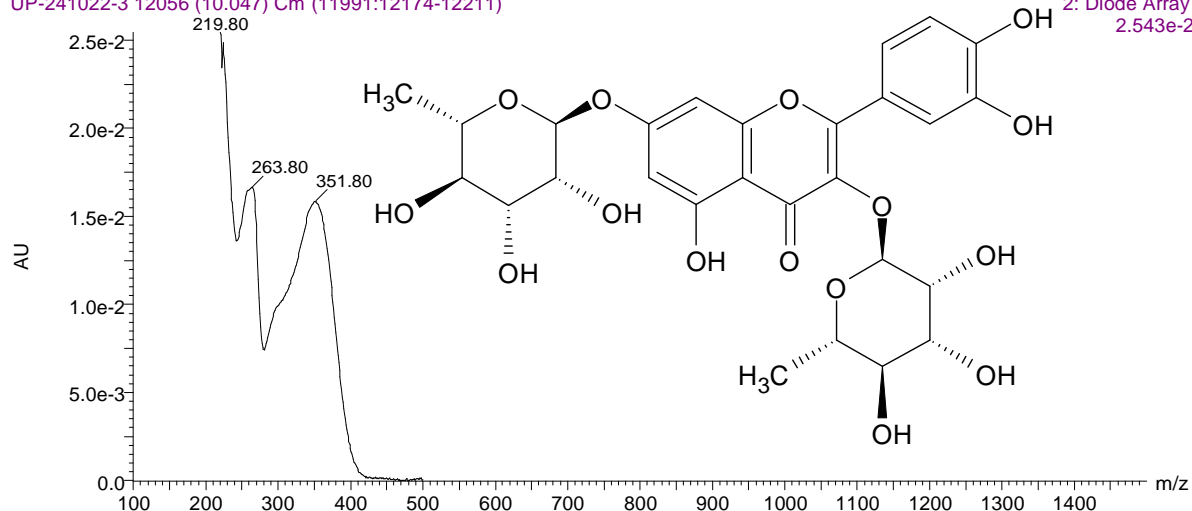
2: Diode Array
2.543e-2

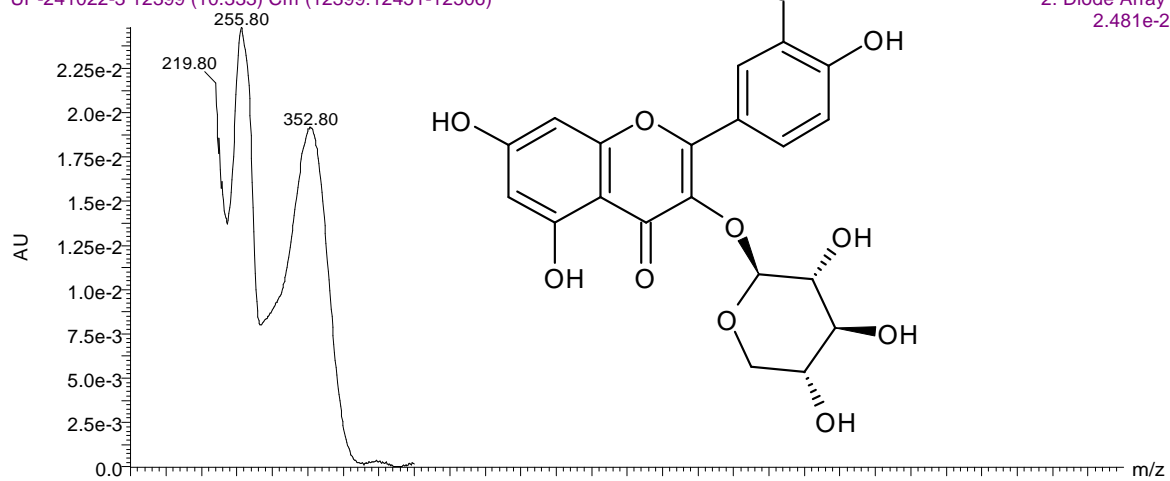
Рисунок 5 - Хроматограмма и строение кверцетин-3,7-дирамнозида.

ExEtOH-1 Quercetin 3-Xyloside

UP-241022-3 12399 (10.333) Cm (12399:12451-12506)

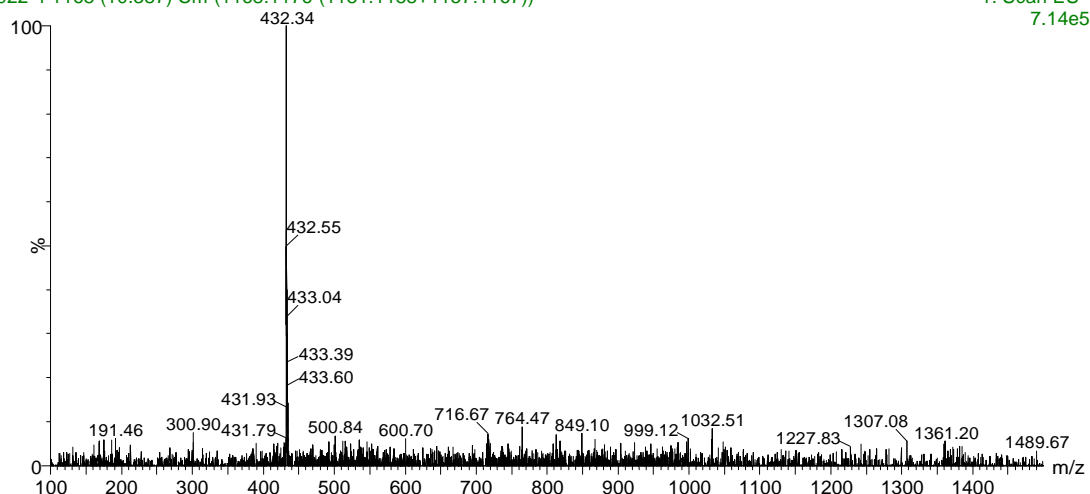
10:29:35 24-Oct-2022

2: Diode Array
2.481e-2



UP-241022-4 1168 (10.387) Cm (1168:1176-(1181:1188+1157:1167))

1: Scan ES-
7.14e5



UP-241022-3 1169 (10.396) Cm (1167:1174-(1160:1166+1178:1183))

1: Scan ES+
1.63e6

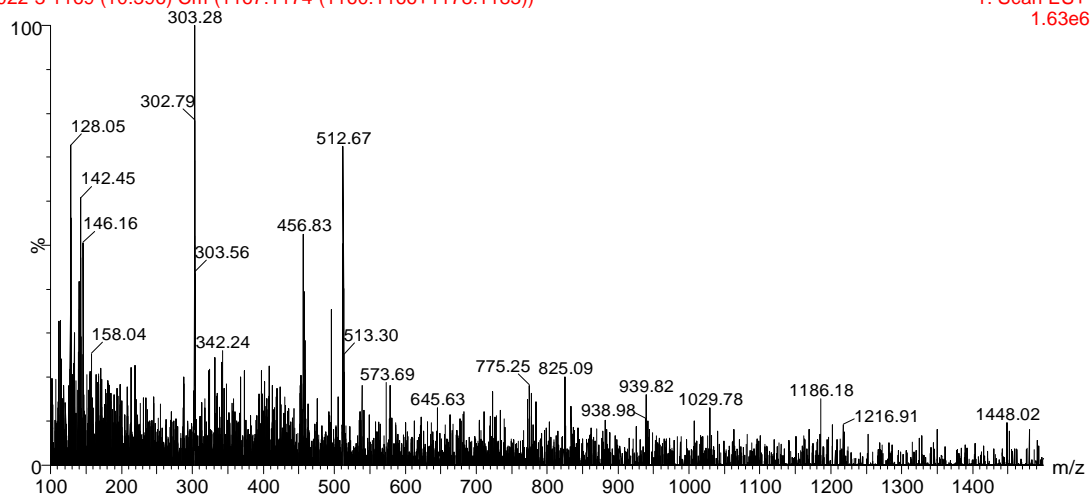


Рисунок 6 - Хроматограмма и строение кверцетин-3-ксилозида.

ExEtOH-1 Quercetin 3-Rhamnoside

UP-241022-3 12910 (10.759) Cm (12854:12968-12799)

10:29:35 24-Oct-2022

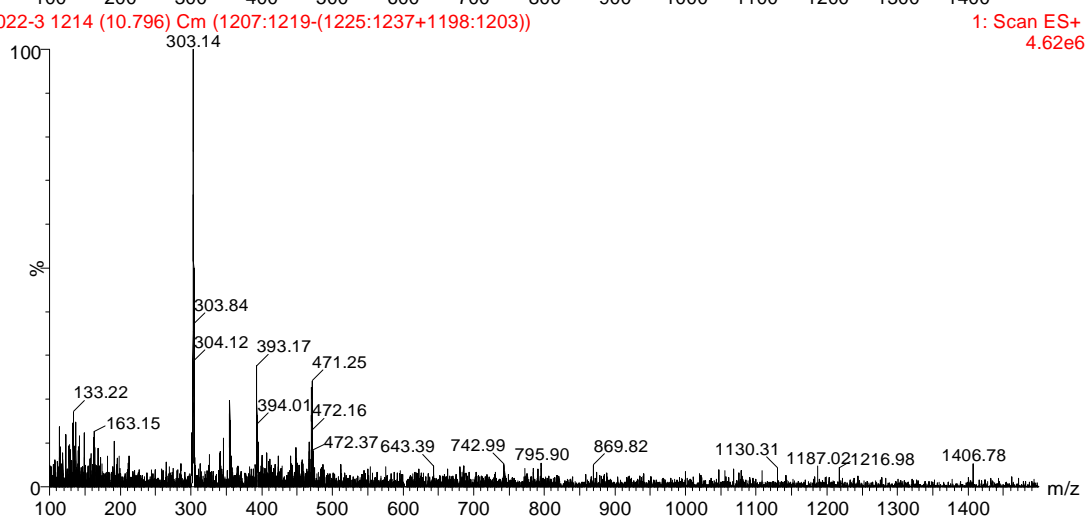
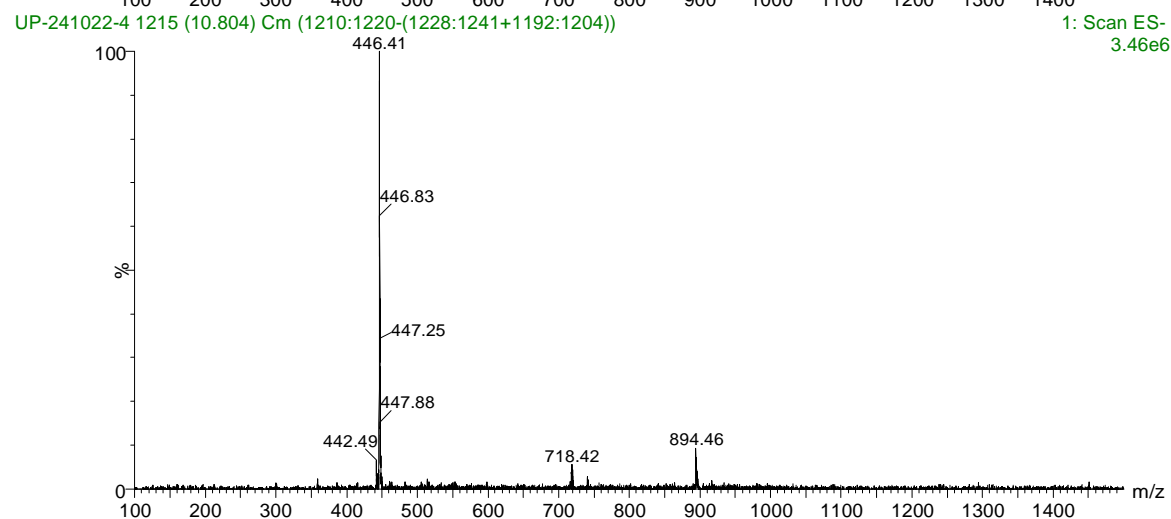
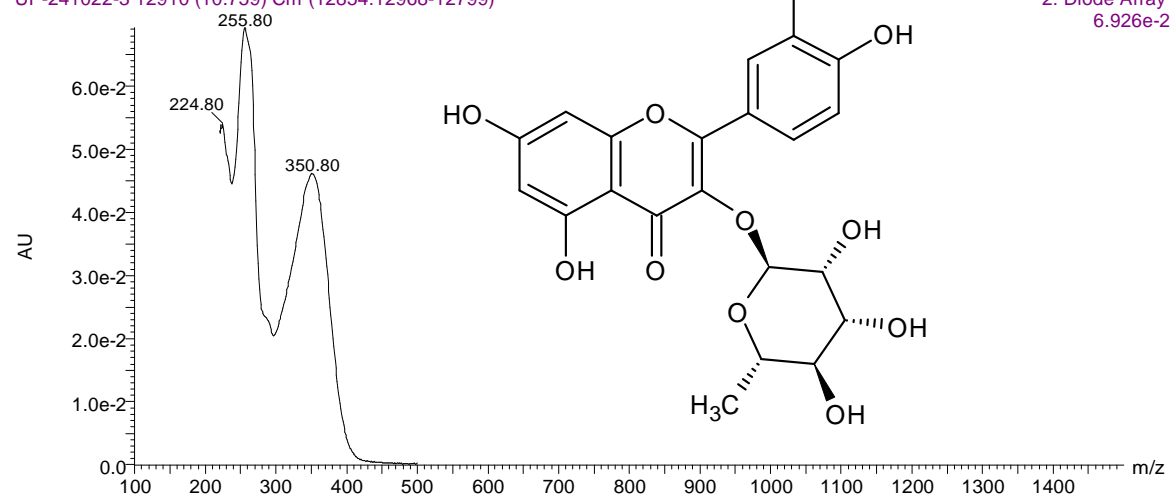
2: Diode Array
6.926e-2

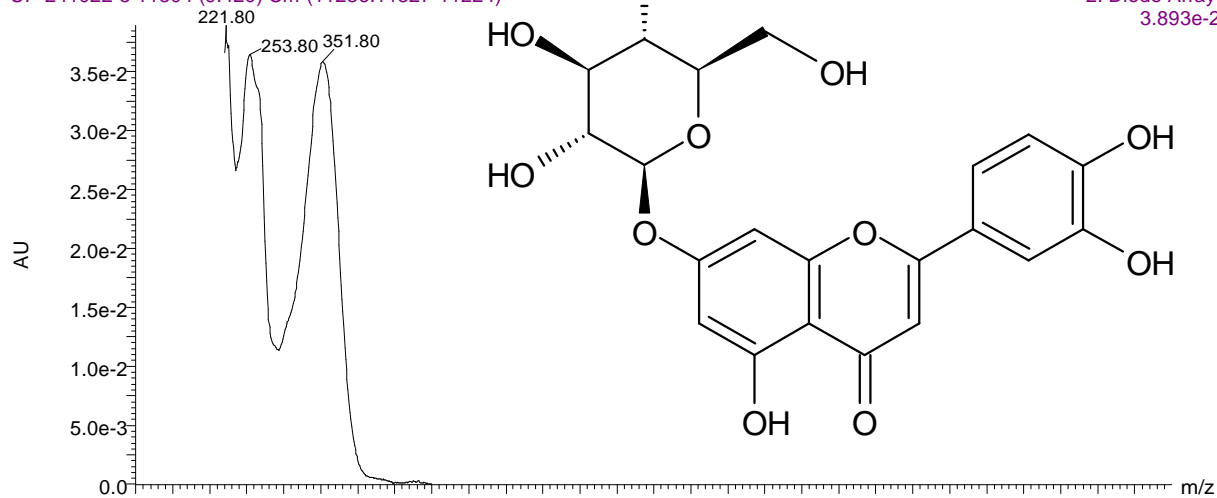
Рисунок 7 - Хроматограмма и строение кверцетин-3-рамнозида.

ExEtOH-1 Luteolin-7-Glucoside

UP-241022-3 11304 (9.420) Cm (11256:11327-11224)

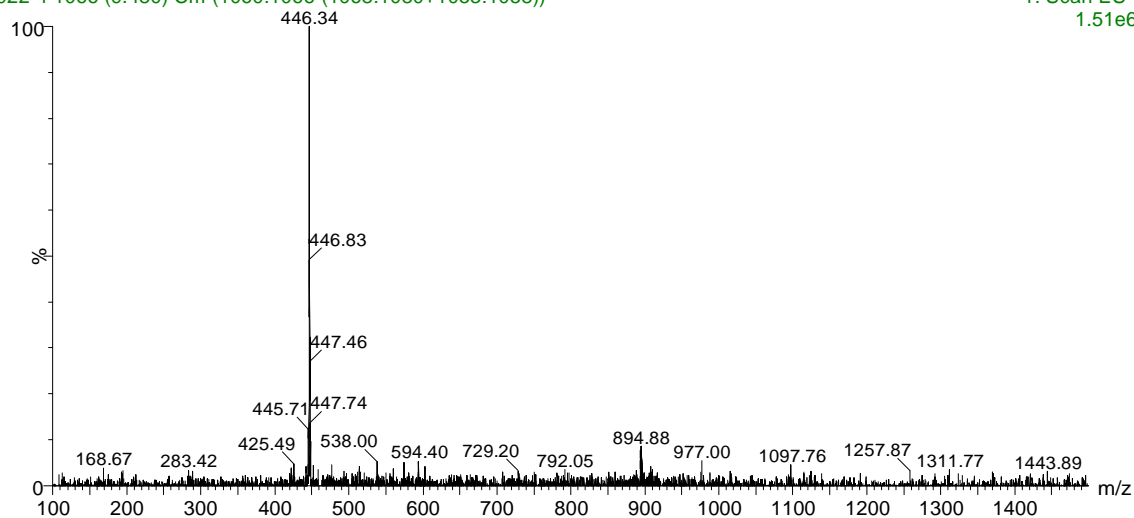
10:29:35 24-Oct-2022

2: Diode Array
3.893e-2



UP-241022-4 1066 (9.480) Cm (1060:1066-(1068:1080+1053:1058))

1: Scan ES-
1.51e6



UP-241022-3 1066 (9.480) Cm (1058:1066-(1067:1078+1051:1056))

1: Scan ES+
1.97e6

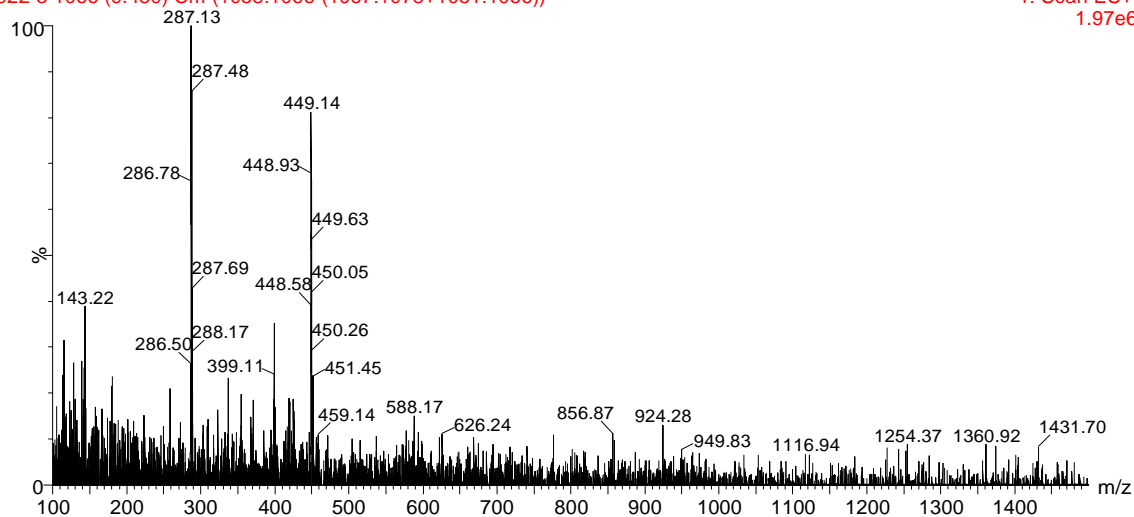


Рисунок 8 - Хроматограмма и строение лютеолин-7-глюкозида.

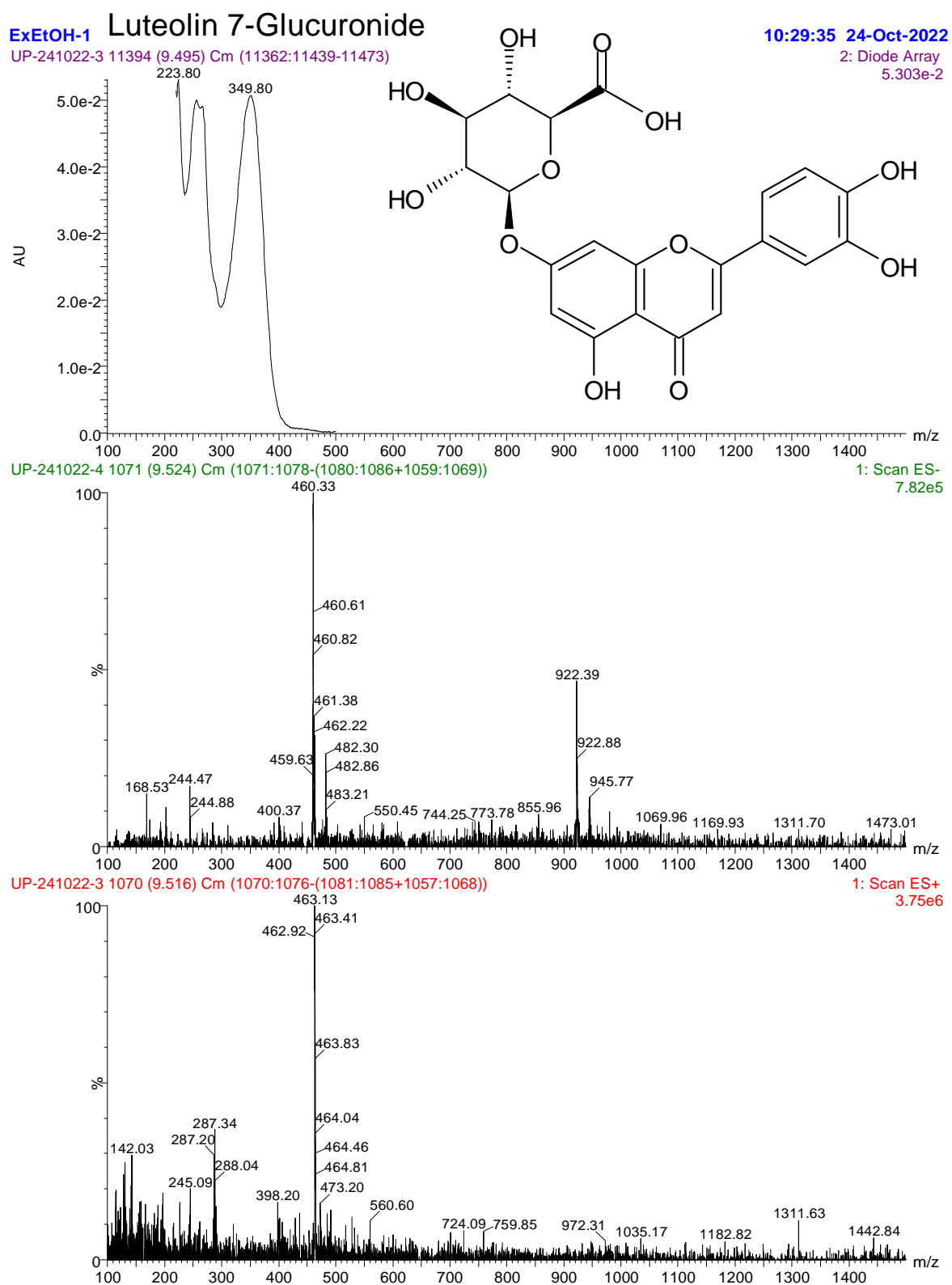
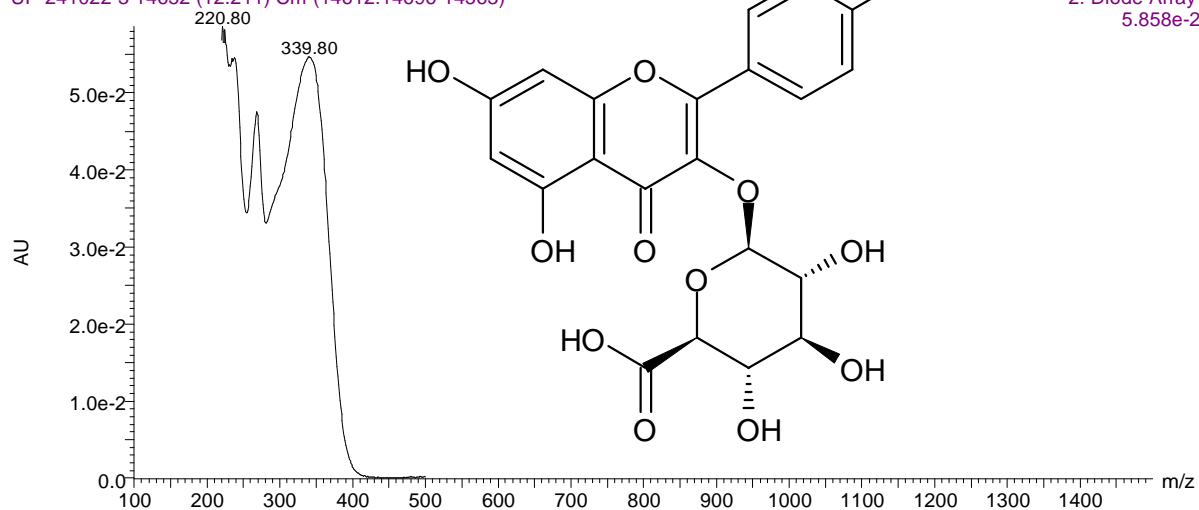


Рисунок 9 - Хроматограмма и строение лютеолин-7-глюкуронида.

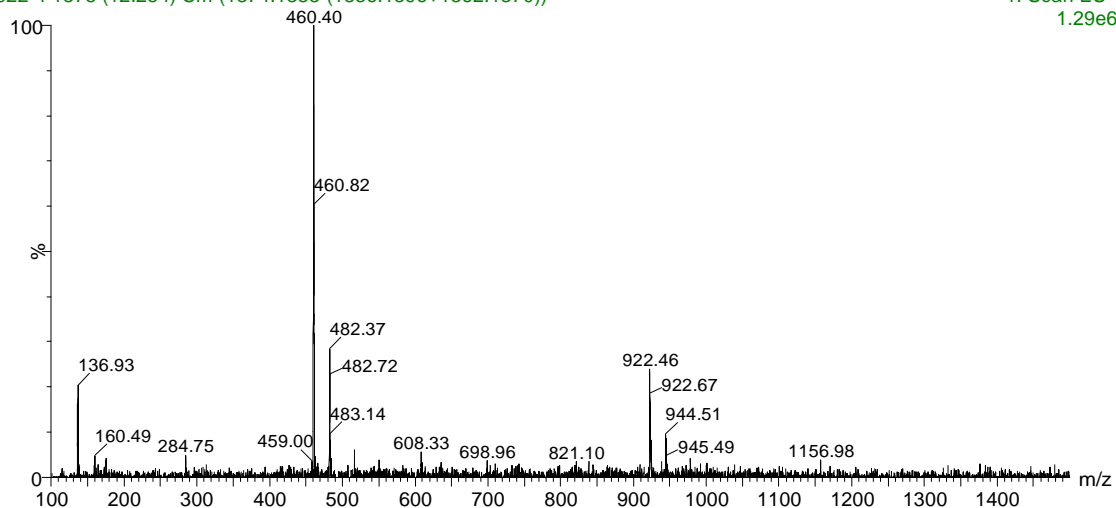
ExEtOH-1 Kaempferol-3-Glucuronide

UP-241022-3 14652 (12.211) Cm (14612:14696-14563)

10:29:35 24-Oct-2022

2: Diode Array
5.858e-2

UP-241022-4 1378 (12.254) Cm (1374:1383-(1386:1396+1362:1370))

1: Scan ES-
1.29e6

UP-241022-3 1378 (12.255) Cm (1373:1382-(1384:1396+1354:1371))

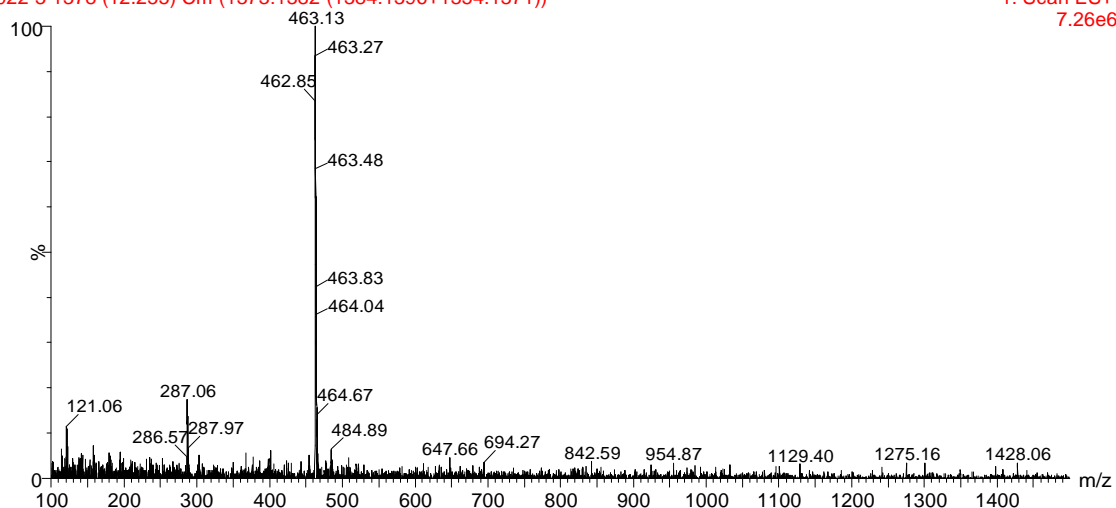
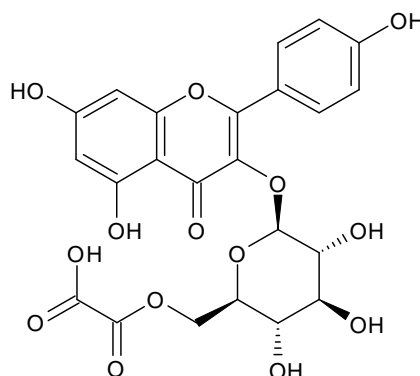
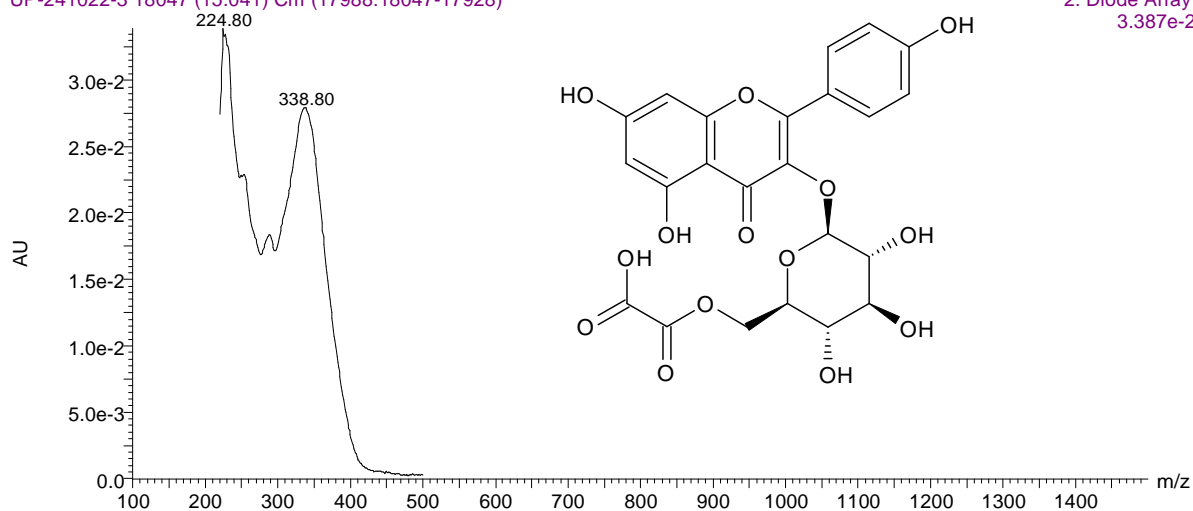
1: Scan ES+
7.26e6

Рисунок 10 - Хроматограмма и строение кемпферол-3-глюкуронида.

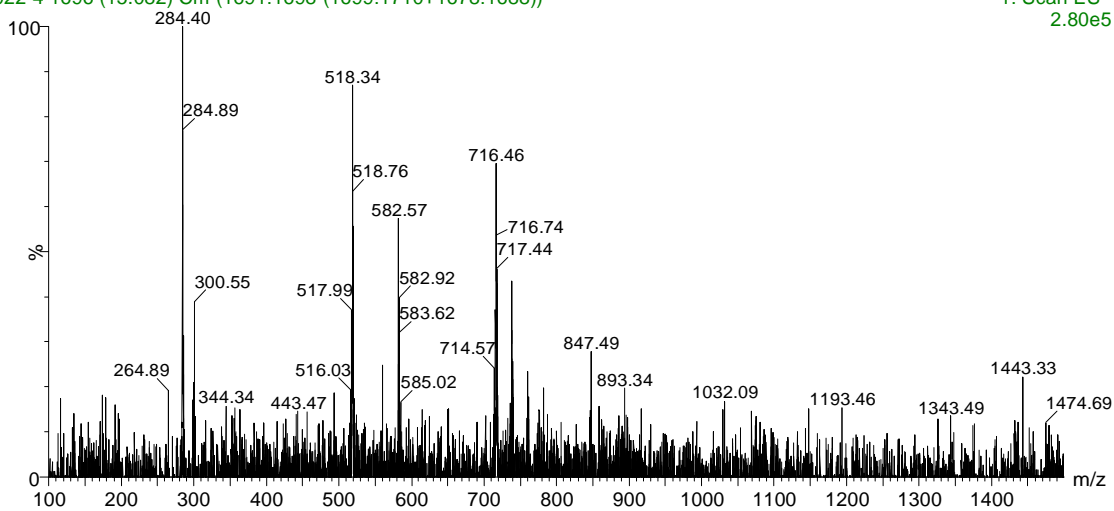
ExEtOH-1 Kaempherol-3-(6'-Oxayl)Glucoside

10:29:35 24-Oct-2022

UP-241022-3 18047 (15.041) Cm (17988:18047-17928)

2: Diode Array
3.387e-2

UP-241022-4 1696 (15.082) Cm (1691:1698-(1699:1710+1678:1688))

1: Scan ES-
2.80e5

UP-241022-3 1696 (15.082) Cm (1688:1696-(1697:1705+1678:1686))

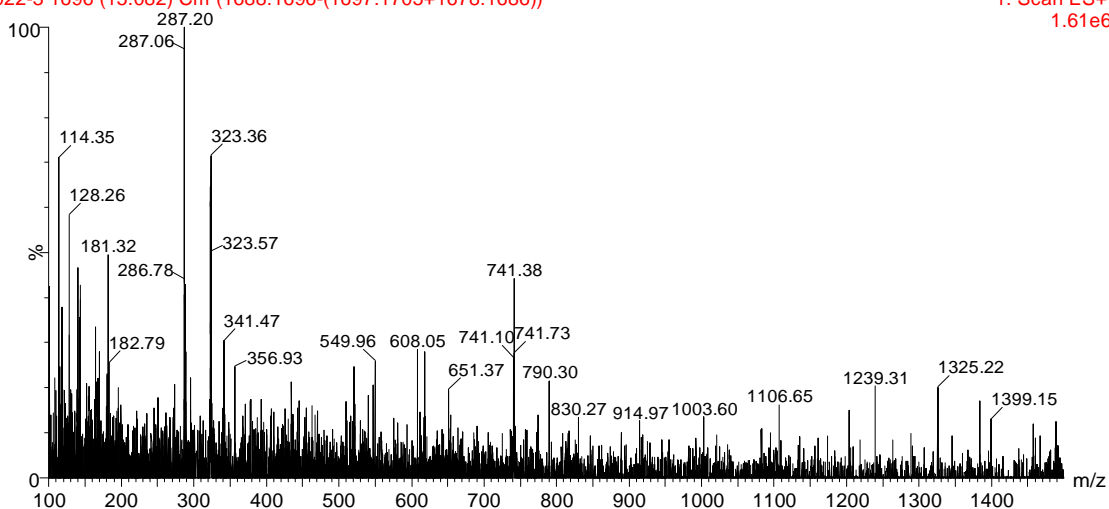
1: Scan ES+
1.61e6

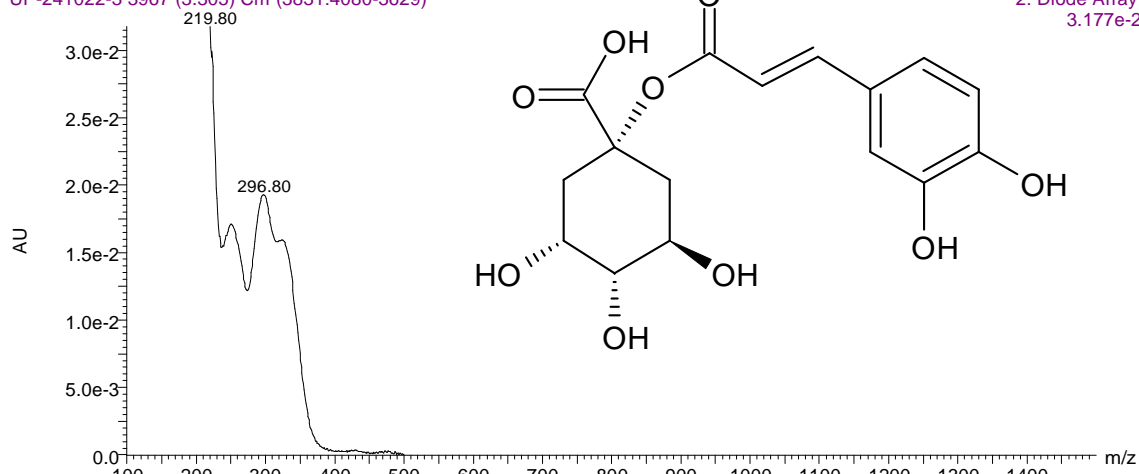
Рисунок 11 - Хроматограмма и строение кемпферол-3-(6'-оксаял)-глюкозида.

ExEtOH-1 1-Caffeoylquinic

UP-241022-3 3967 (3.305) Cm (3831:4080-3629)

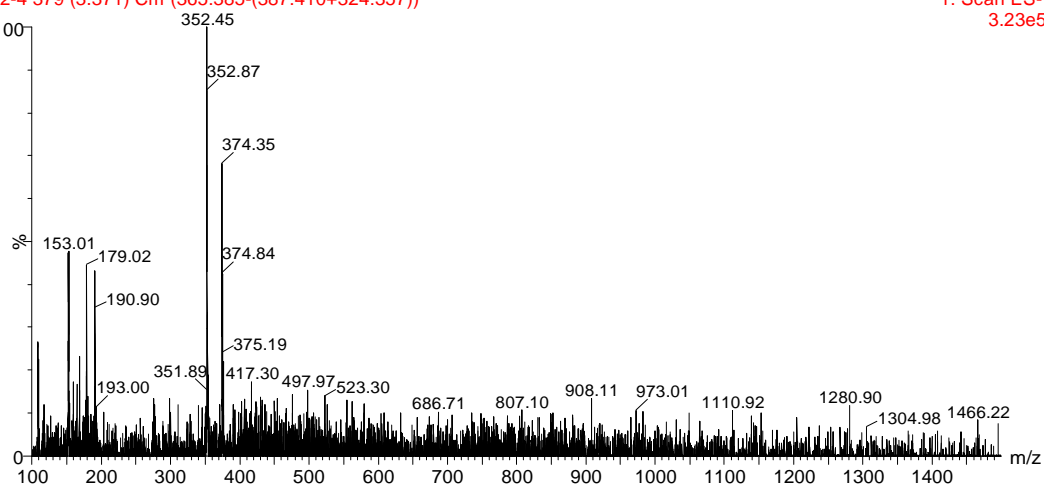
10:29:35 24-Oct-2022

2: Diode Array
3.177e-2



UP-241022-4 379 (3.371) Cm (365:385-(387:410+324:357))

1: Scan ES-
3.23e5



UP-241022-3 397 (3.531) Cm (366:398-(402:450+328:359))

1: Scan ES+
1.65e6

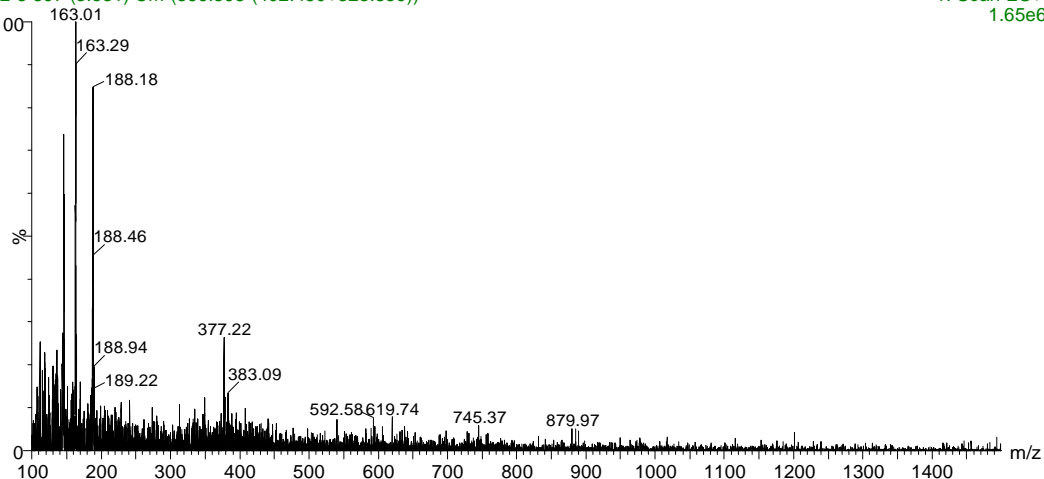


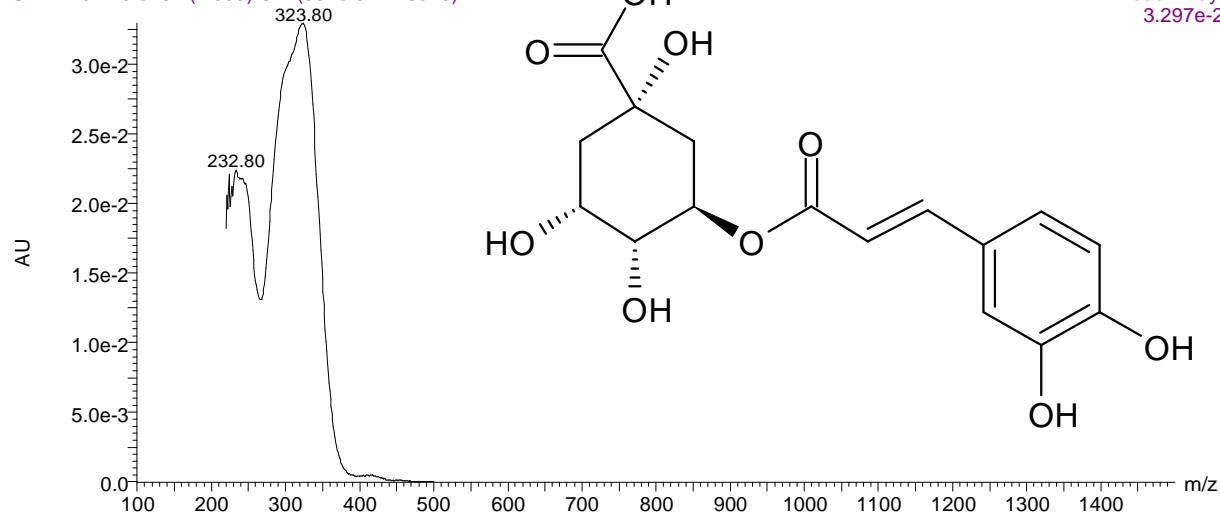
Рисунок 12 - Хроматограмма и строение 1- кофеилхиновой кислоты.

ExEtOH-1 Chlorogenic acid

UP-241022-3 5404 (4.503) Cm (5346:5471-5943)

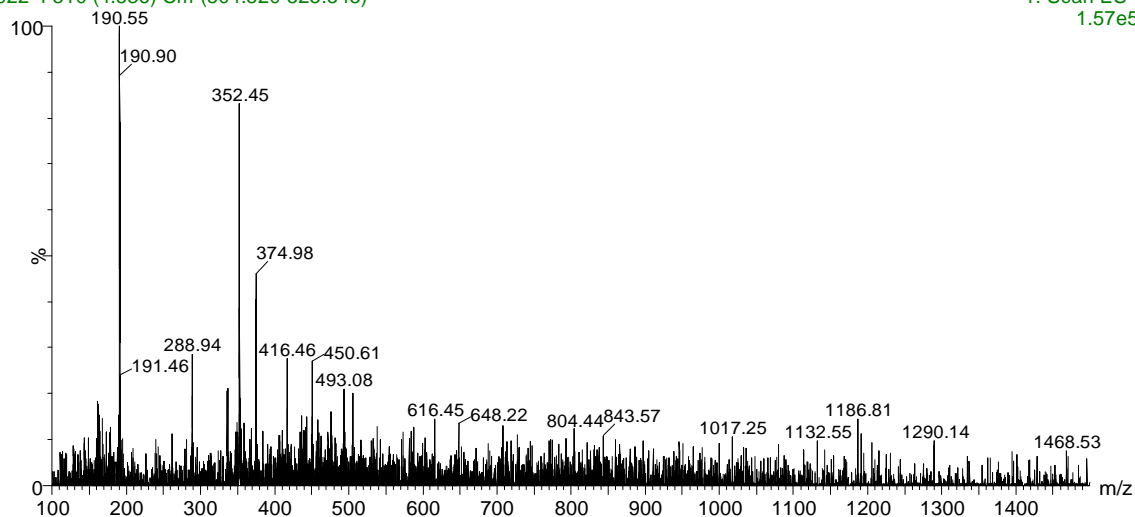
10:29:35 24-Oct-2022

2: Diode Array
3.297e-2



UP-241022-4 510 (4.536) Cm (504:520-525:545)

1: Scan ES-
1.57e5



UP-241022-3 512 (4.553) Cm (504:518-523:555)

1: Scan ES+
3.23e6

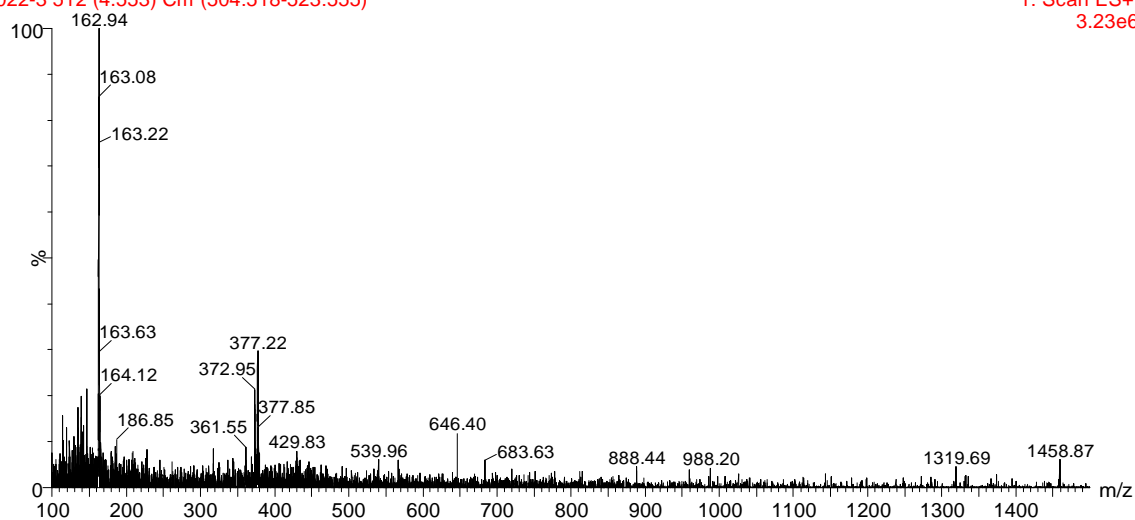
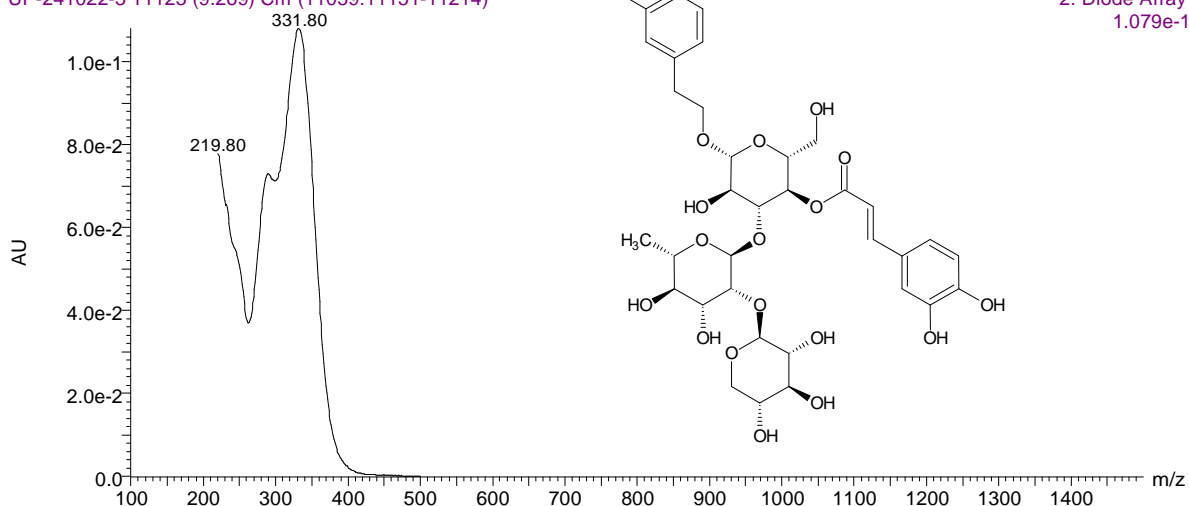


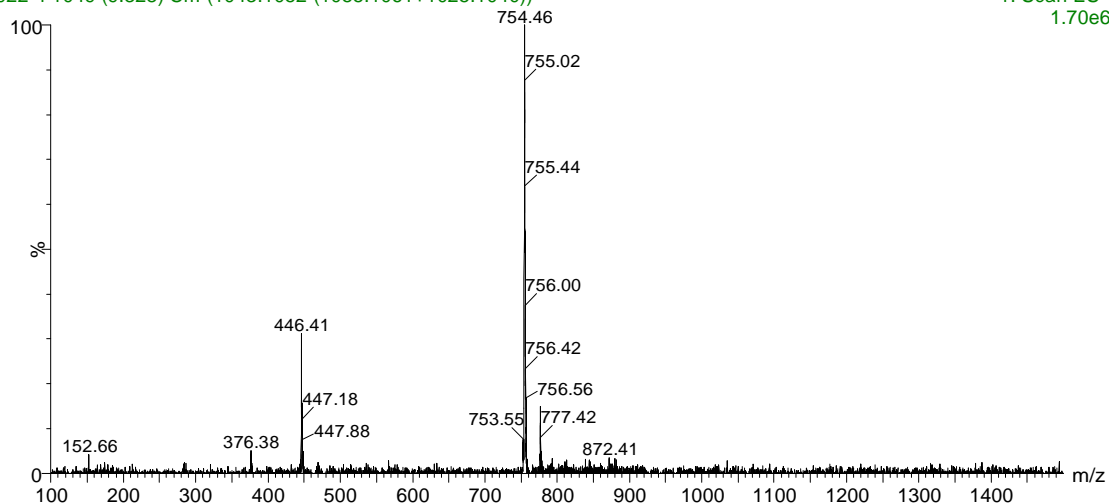
Рисунок 13 - Хроматограмма и строение хлорогеновой кислоты.

ExEtOH-1 Lavandulifolioside
 UP-241022-3 11123 (9.269) Cm (11059:11151-11214)

10:29:35 24-Oct-2022

2: Diode Array
1.079e-1

UP-241022-4 1049 (9.328) Cm (1043:1052-(1055:1061+1025:1040))

1: Scan ES-
1.70e6

UP-241022-3 1048 (9.320) Cm (1042:1054-(1055:1061+1029:1037))

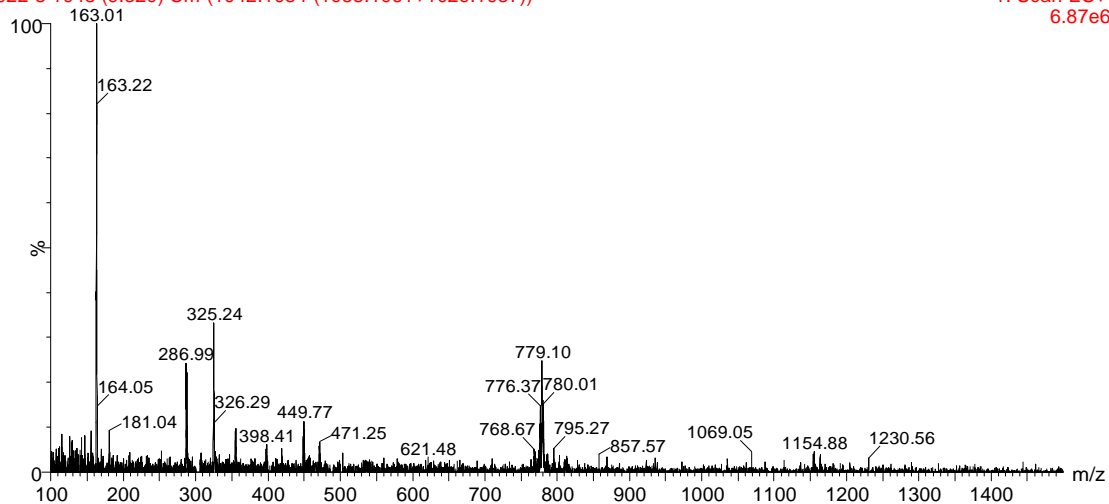
1: Scan ES+
6.87e6

Рисунок 14 - Хроматограмма и строение лавандулифоллиозида.

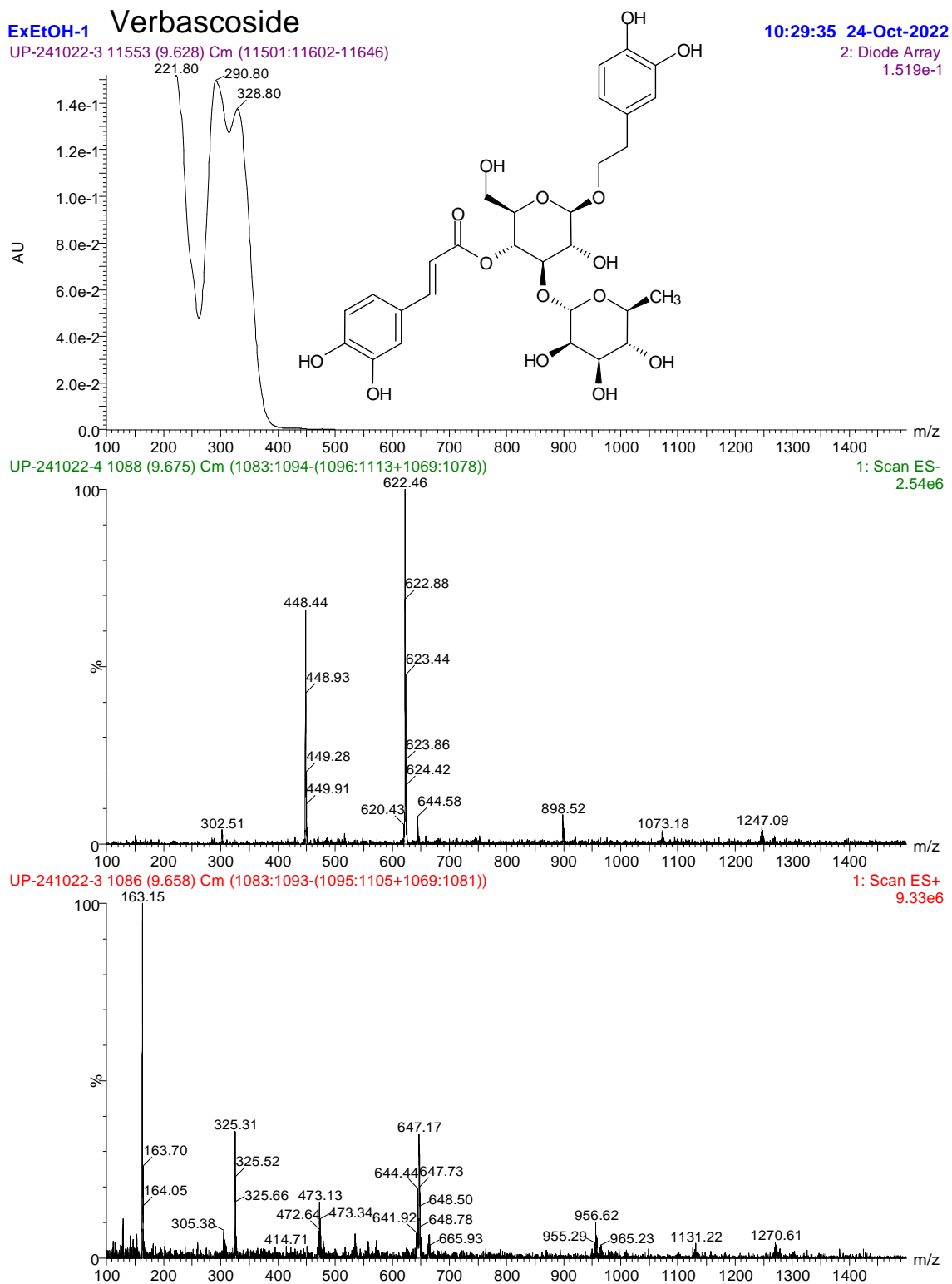
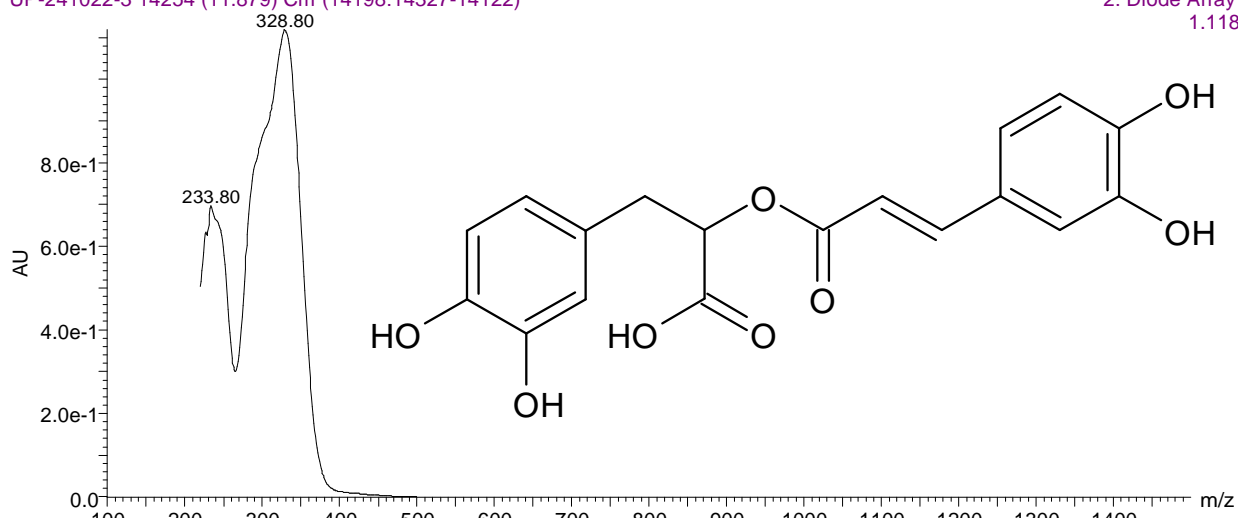


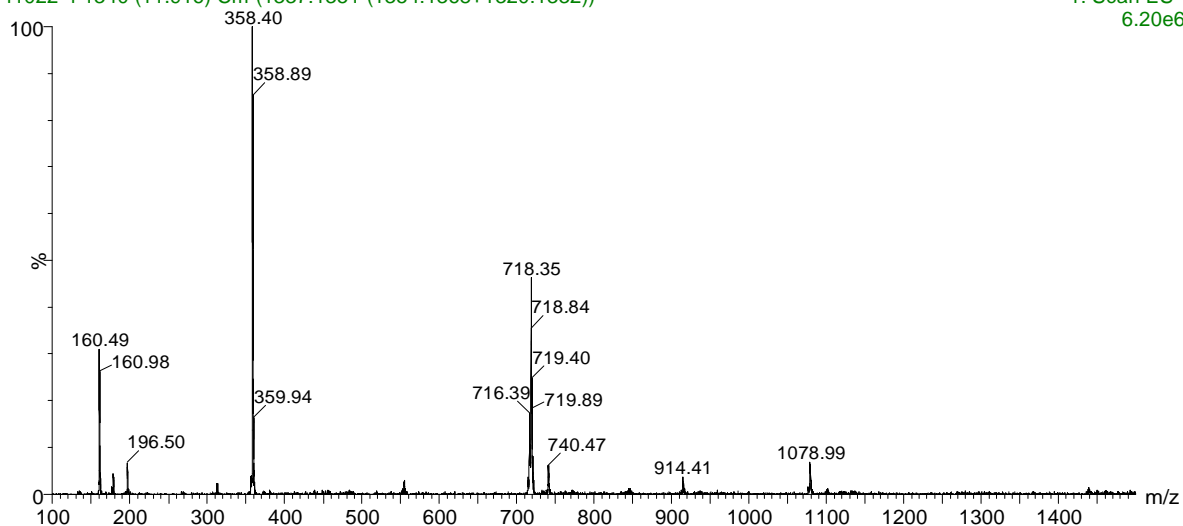
Рисунок 15 - Хроматограмма и строение вербаскозида.

ExEtOH-1 Rosmarinic Acid
 UP-241022-3 14254 (11.879) Cm (14198:14327-14122)

10:29:35 24-Oct-2022
 2: Diode Array
 1.118



UP-241022-4 1340 (11.916) Cm (1337:1351-(1354:1368+1320:1332))
 1: Scan ES-
 6.20e6



UP-241022-3 1339 (11.908) Cm (1332:1350-(1352:1375+1317:1329))

1: Scan ES+
 3.47e7

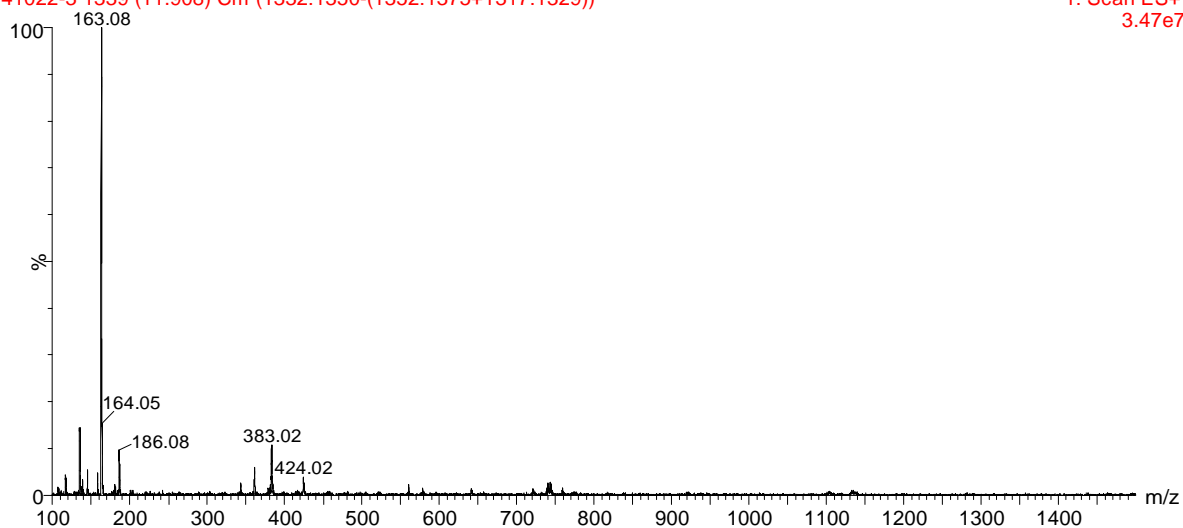


Рисунок 16 - Хроматограмма и строение розмариновой кислоты.

ExEtOH-1 Salvianolic Acid D

10:29:35 24-Oct-2022

UP-241022-3 15025 (12.522) Cm (14978:15086-14954)

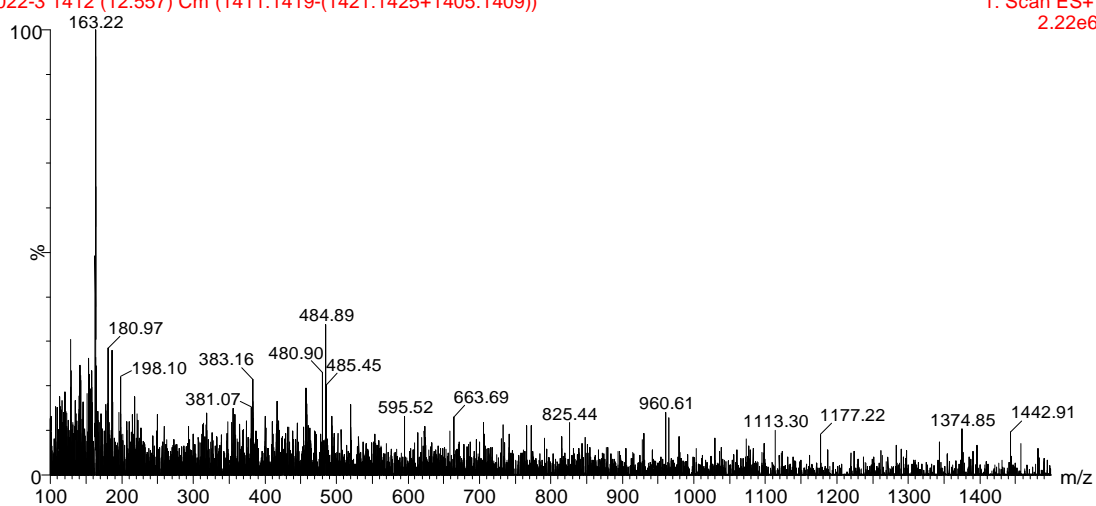
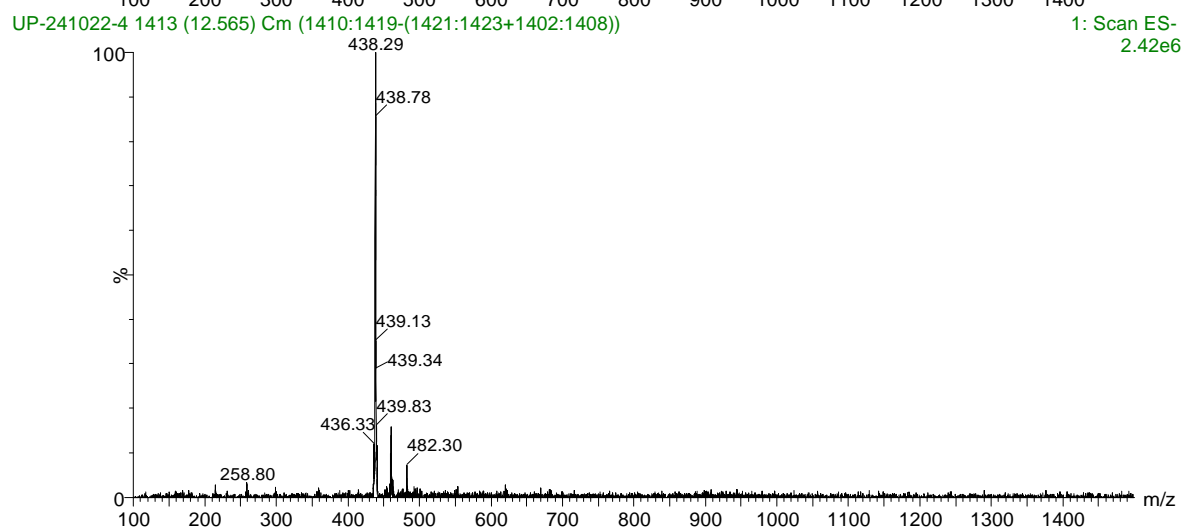
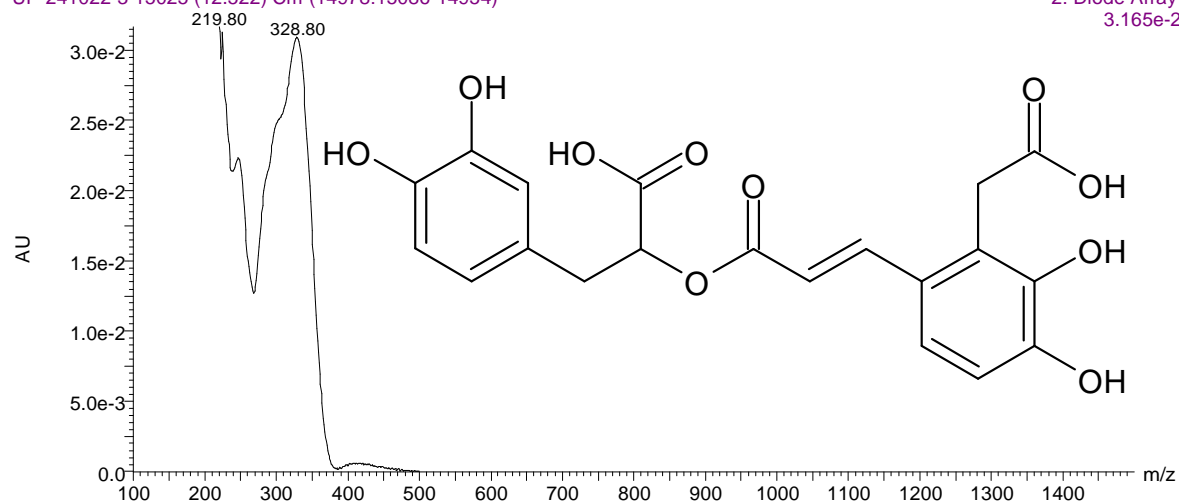
2: Diode Array
3.165e-2

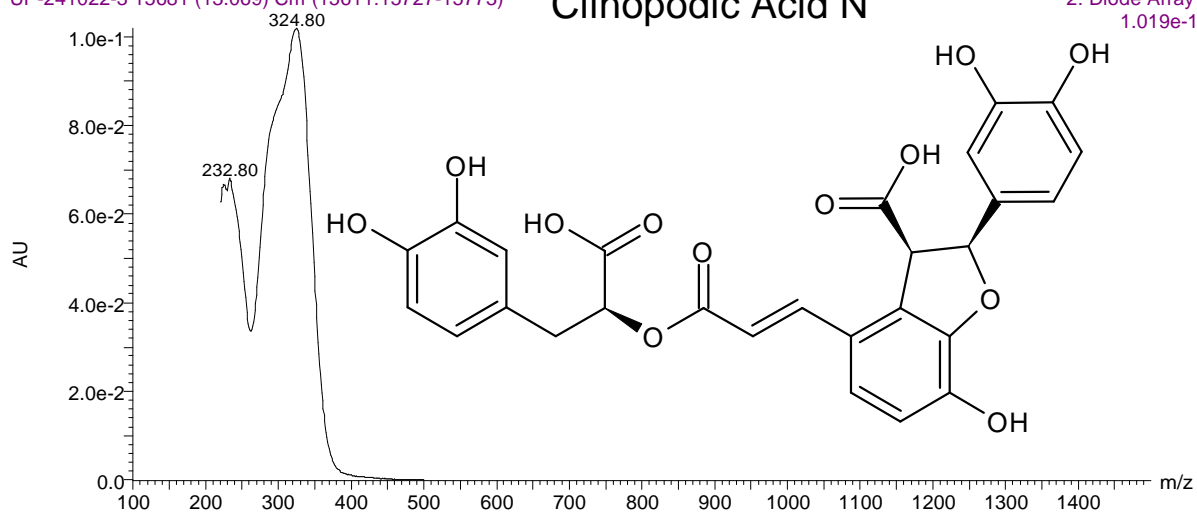
Рисунок 17 - Хроматограмма и строение сальвианоловой кислоты D.

ExEtOH-1

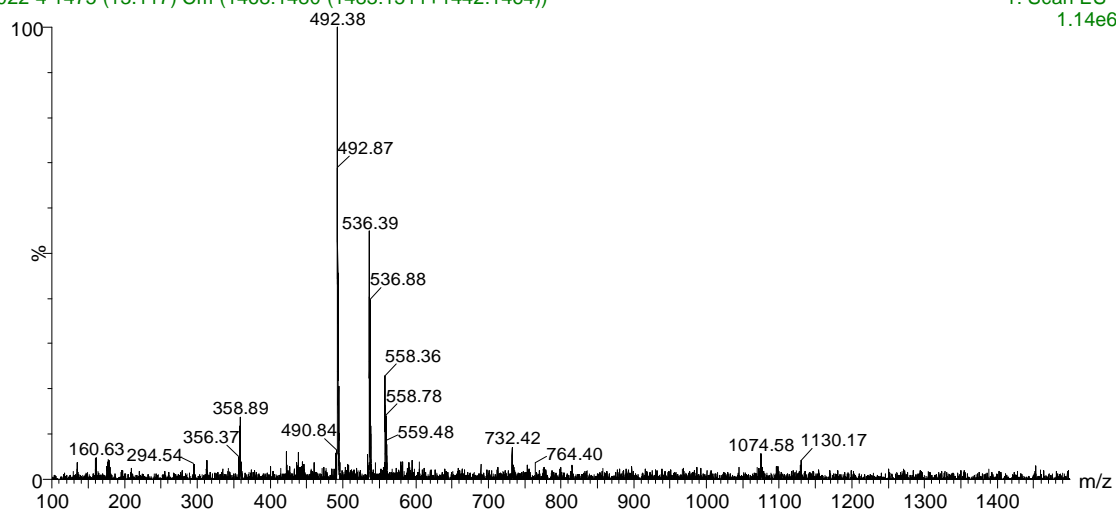
UP-241022-3 15681 (13.069) Cm (15611:15727-15773)

Clinopodic Acid N

10:29:35 24-Oct-2022

2: Diode Array
1.019e-1

UP-241022-4 1475 (13.117) Cm (1468:1480-(1483:1511+1442:1464))

1: Scan ES-
1.14e6

UP-241022-3 1474 (13.108) Cm (1467:1480-(1484:1499+1447:1457))

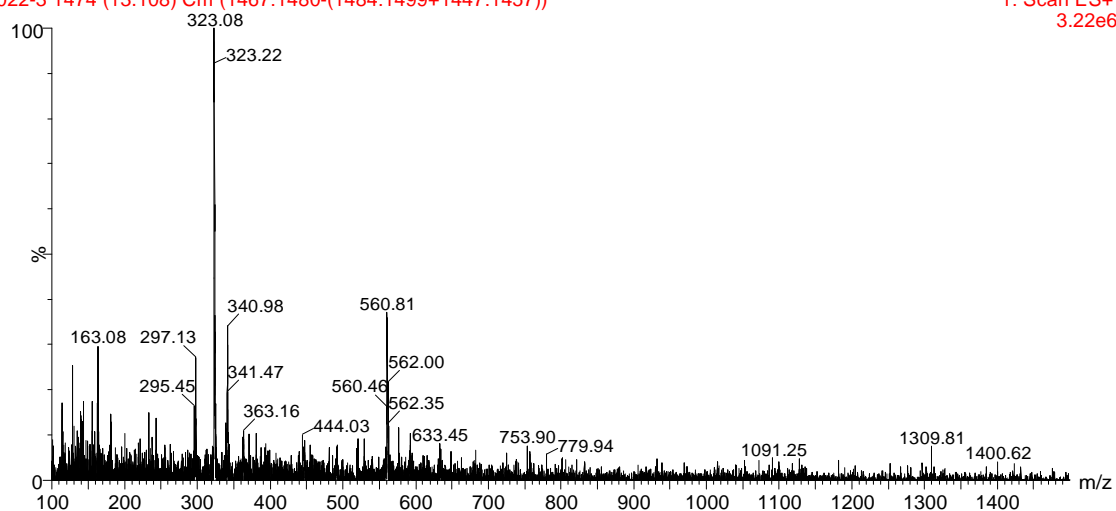
1: Scan ES+
3.22e6

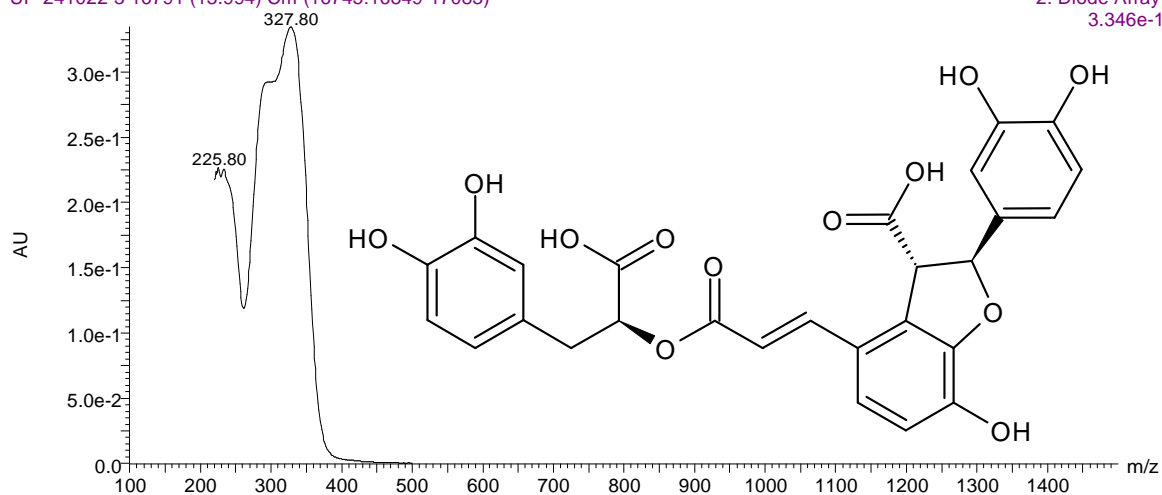
Рисунок 18 - Хроматограмма и строение клиноподиевой кислоты N.

ExEtOH-1 Lithospermic acid

UP-241022-3 16791 (13.994) Cm (16745:16849-17083)

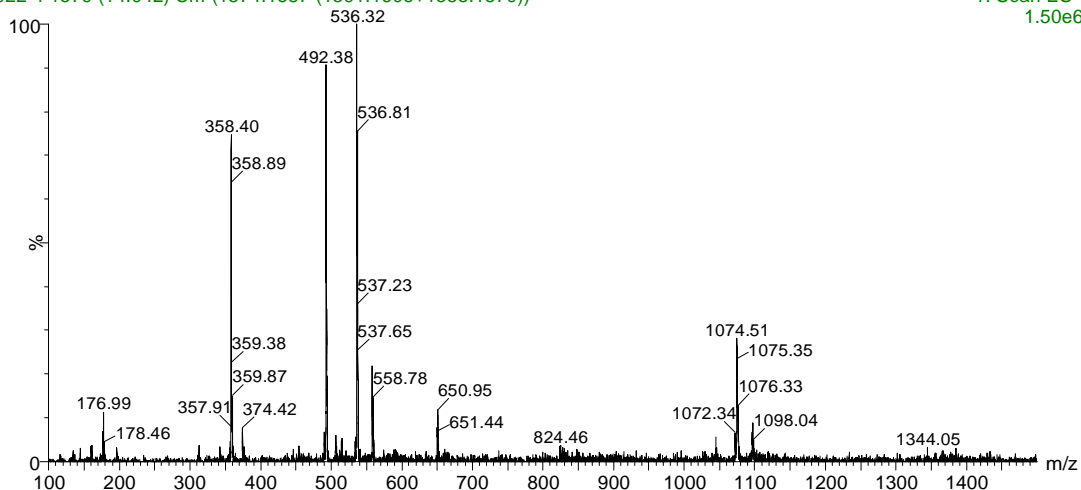
10:29:35 24-Oct-2022

2: Diode Array
3.346e-1



UP-241022-4 1579 (14.042) Cm (1574:1587-(1591:1606+1555:1570))

1: Scan ES-
1.50e6



UP-241022-3 1578 (14.033) Cm (1572:1587-(1589:1603+1554:1570))

1: Scan ES+
8.01e6

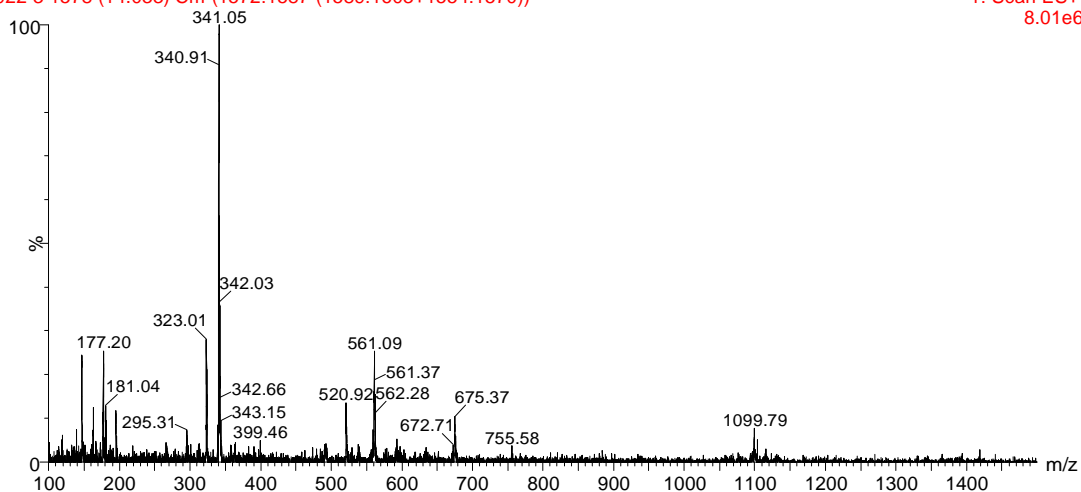


Рисунок 19 - Хроматограмма и строение литоспермической кислоты N.

ExEtOH-1 2',8'-Biapigenin
UP-241022-3 23519 (19.602) Cm (23474:23574-23633)

10:29:35 24-Oct-2022

2: Diode Array
2.691e-2

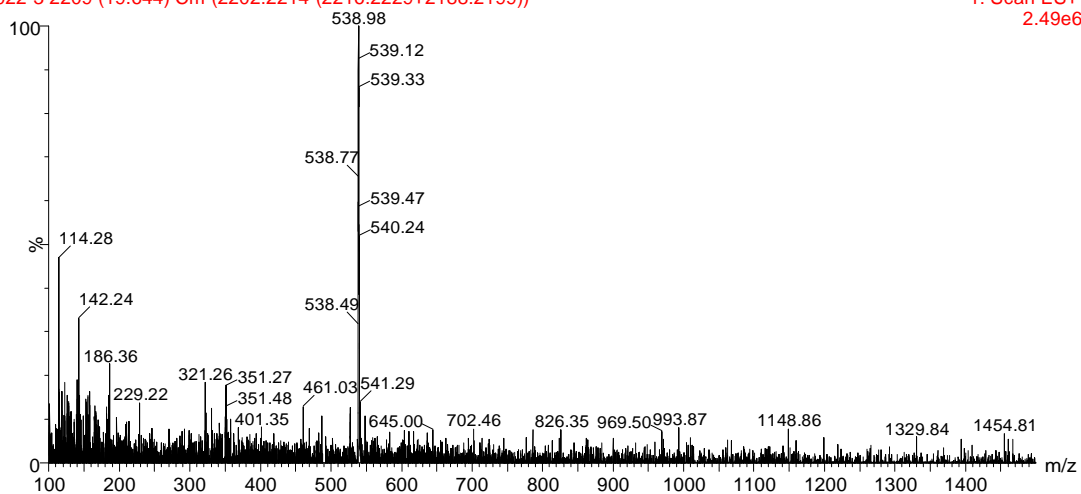
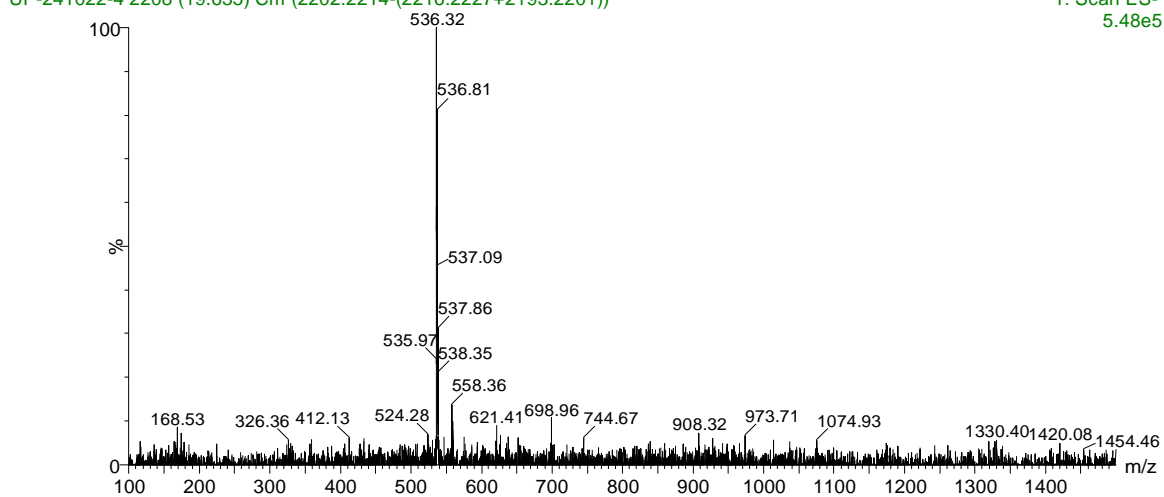
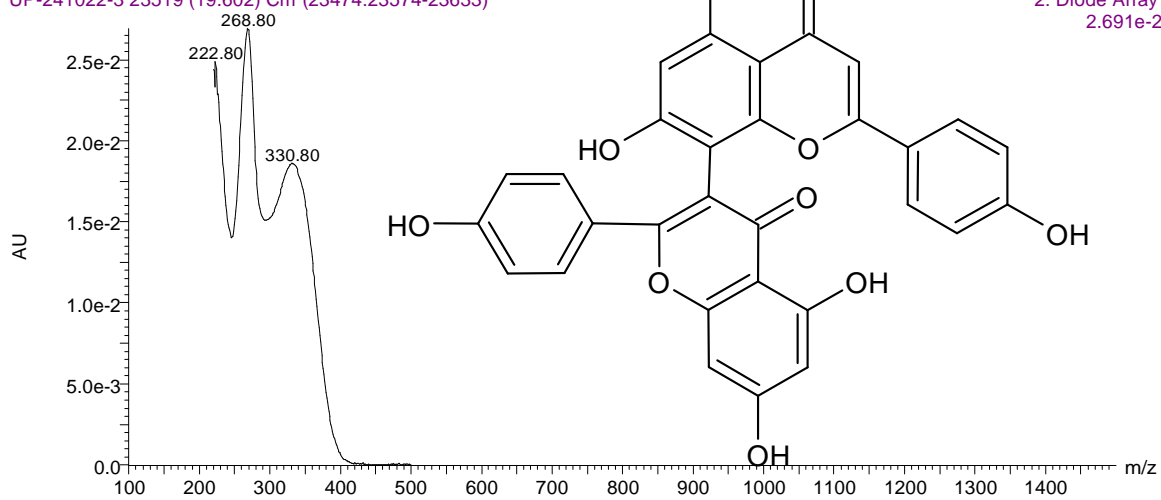


Рисунок 20 - Хроматограмма и строение 2',8'-биапигенина.

Рисунки 20 – 22 – Вещества с точно не установленной структурой:

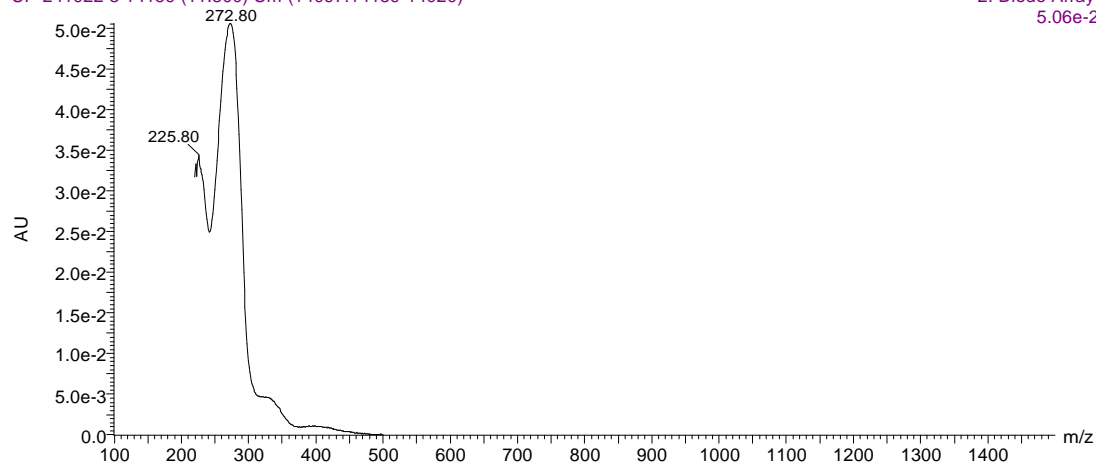
ExEtOH-1 X-273nm-600m

UP-241022-3 14159 (11.800) Cm (14097:14159-14020)

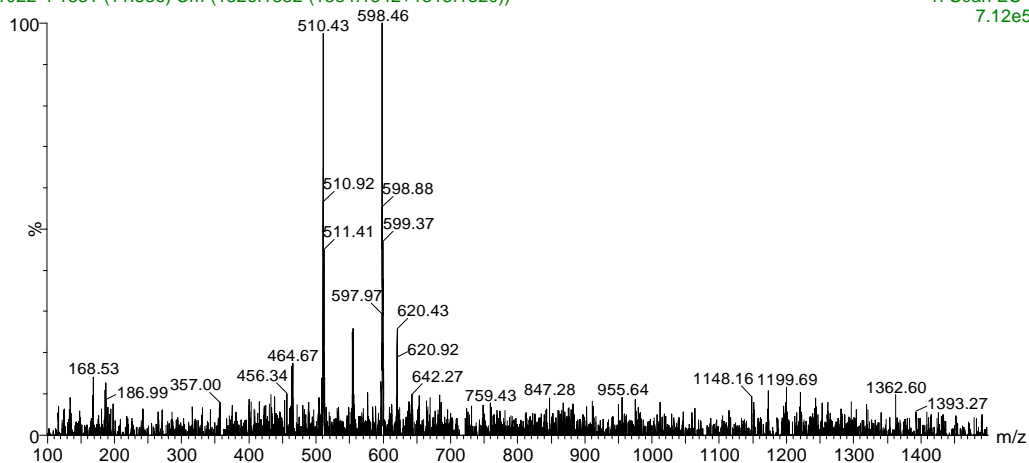
10:29:35 24-Oct-2022

2: Diode Array

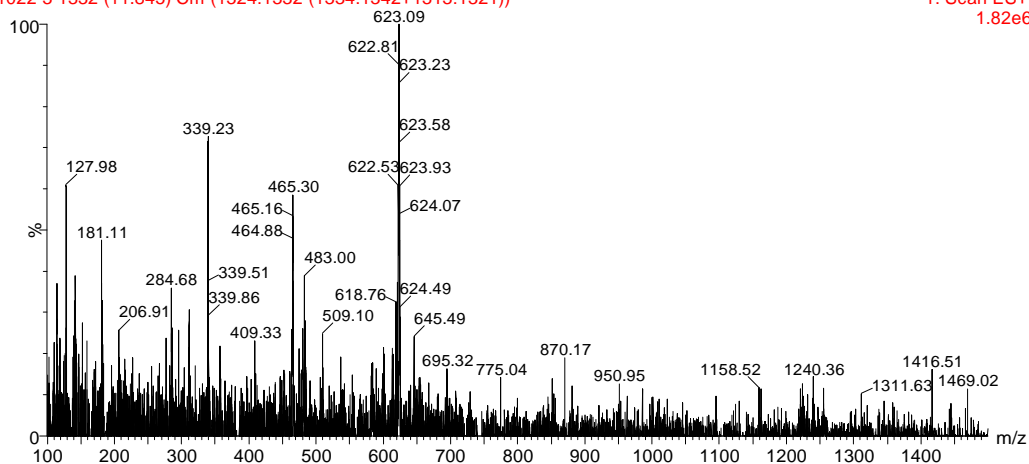
5.06e-2



UP-241022-4 1331 (11.836) Cm (1326:1332-(1334:1342+1313:1320))

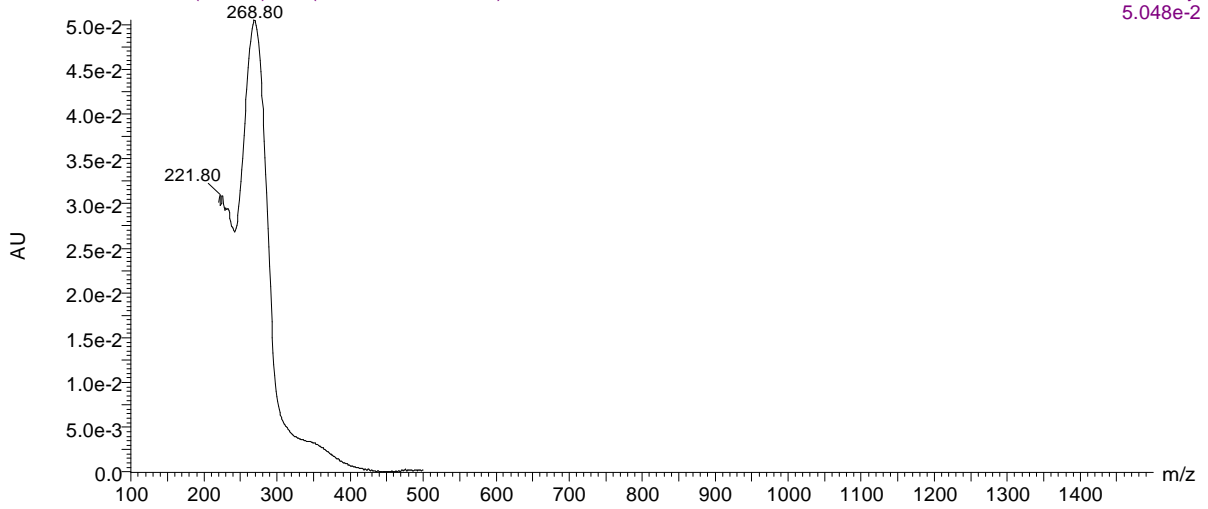
1: Scan ES-
7.12e5

UP-241022-3 1332 (11.845) Cm (1324:1332-(1334:1342+1313:1321))

1: Scan ES+
1.82e6

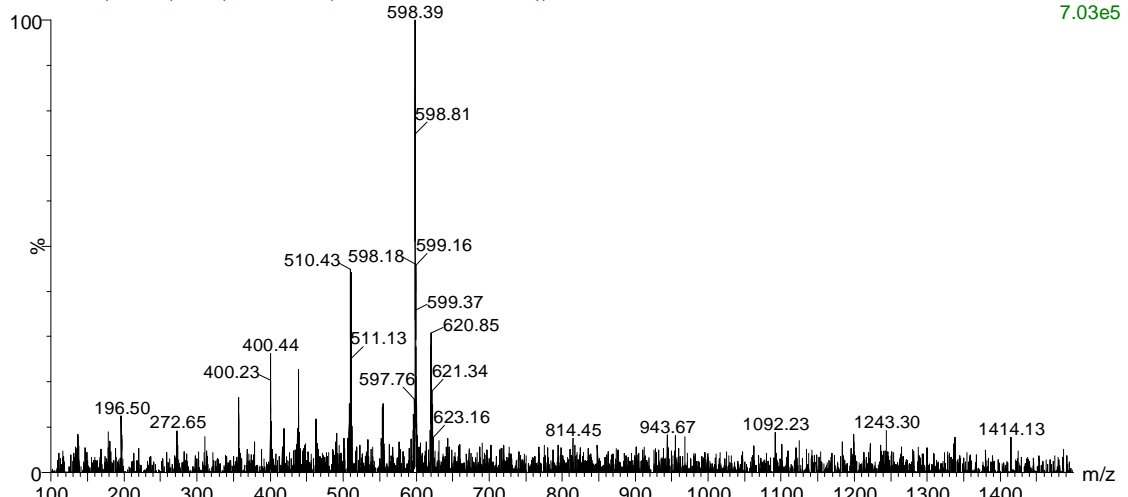
ExEtOH-1 X-269nm-600m
UP-241022-3 14764 (12.304) Cm (14728:14806-14841)

10:29:35 24-Oct-2022
2: Diode Array
5.048e-2



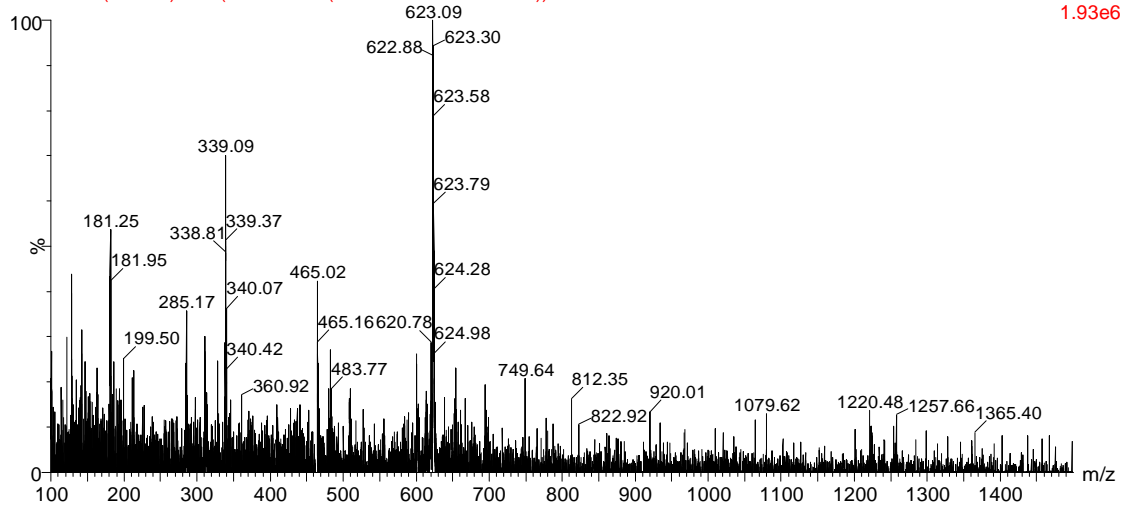
UP-241022-4 1389 (12.352) Cm (1386:1392-(1397:1404+1371:1383))

1: Scan ES-
7.03e5



UP-241022-3 1388 (12.343) Cm (1383:1392-(1395:1404+1375:1382))

1: Scan ES+
1.93e6

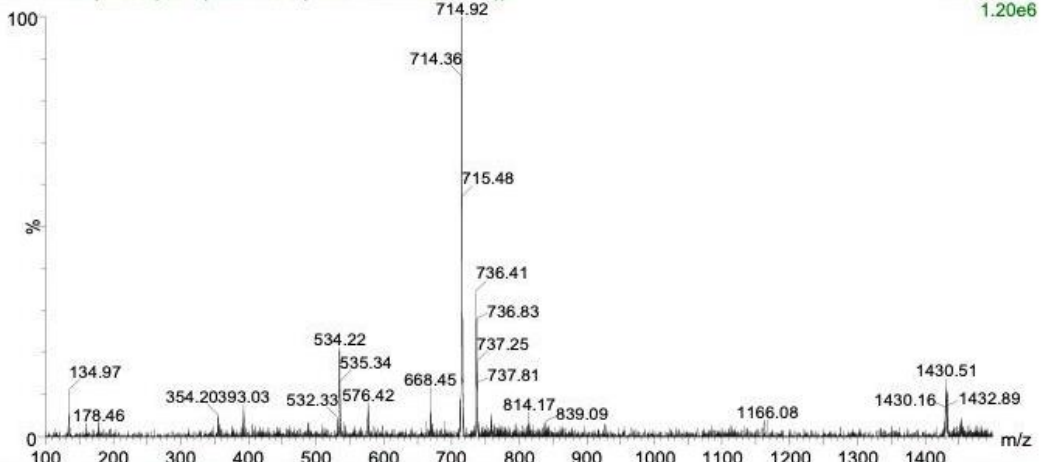


ExEtOH-1 X-316nm-716m
 UP-241022-3 20237 (16.866) Cm (20177:20307-20010)

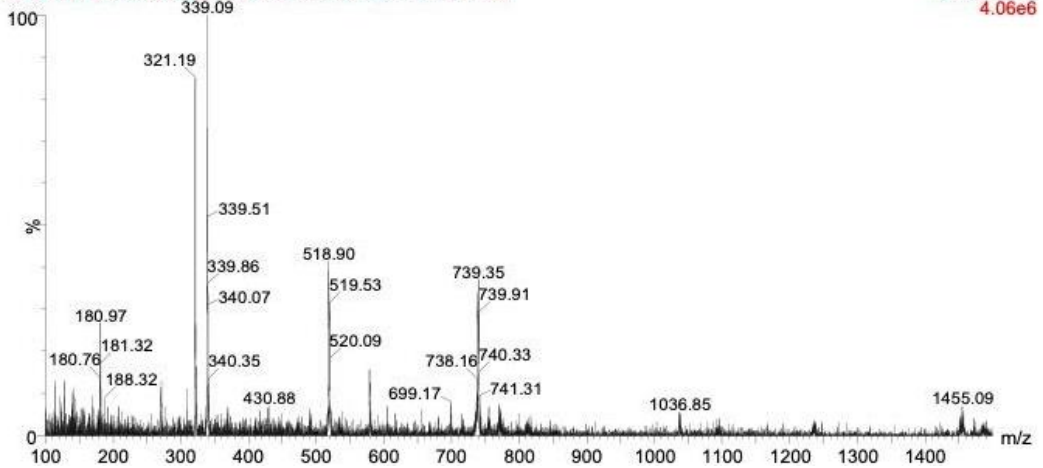
10:29:35 24-Oct-2022
 2: Diode Array
 1.188e-1



UP-241022-4 1900 (16.896) Cm (1895:1907-(1915:1921+1857:1886))



UP-241022-3 1901 (16.905) Cm (1893:1907-(1909:1918+1867:1885))





**МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

**ФАКУЛЬТЕТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

Ломоносовский проспект, д.27, корп.1, Москва, 119991

Тел.: (495) 932-88-14, факс: (499) 726-55-47

E-mail: info@fbm.msu.ru

01.03.2023 № 092-23/110-03

На № _____

Акт

о внедрении в учебный процесс результатов диссертационной работы

Прожогиной Юлии Эдуардовны

Наименование диссертационной работы: «Эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты биологически активных веществ из растительной композиции» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.1. – Промышленная фармация и технология получения лекарств.

Предмет внедрения: результаты диссертационной работы по разработке состава и технологии глубоких эвтектических растворителей для экстракции биологически активных веществ из растительной композиции.

Источник информации: материалы диссертационной работы Прожогиной Ю.Э. Научный руководитель: докт. фармацевт. наук, доцент Джавахян Марина Аркадьевна. Работа выполнена на кафедре фармацевтической технологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова и в экспериментально – технологическом отделе Центра химии и фармацевтической технологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений

Основные результаты внедрения: результаты диссертационного исследования включены в лекционный материал по дисциплине «Фармацевтическая технология», раздел «Получение экстракционных препаратов».

Заместитель декана ФФМ
по учебной работе

Е.И. Каленикова



ПАТЕНТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2782459

Способ экстракции флавоноидов из растительного сырья

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений" (RU)*

Авторы: *Джавахири Марина Аркадьевна (RU), Татаринцева Алена Юрьевна (RU), Дул Вячеслав Николаевич (RU), Даргаева Тамара Дарижаповна (RU), Семкина Ольга Александровна (RU), Борисенко Елена Валерьевна (RU), Сидельников Николай Иванович (RU), Прожогина Юлия Эдуардовна (RU)*

Заявка № 2021126053
Приоритет изобретения 03 сентября 2021 г.
Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 27 октября 2022 г.
Срок действия исключительного права на изобретение истекает 03 сентября 2041 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности
Ю.С. Зубов



ПАТЕНТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2794516

**Способ экстракции полифенольных соединений из
змееголовника молдавского**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Всероссийский научно-
исследовательский институт лекарственных и
ароматических растений" (RU)*

Авторы: *Джавахиян Марина Аркадьевна (RU), Павельева Олеся
Константиновна (RU), Бурова Алла Евгеньевна (RU),
Прожогина Юлия Эдуардовна (RU), Павельев Станислав
Алексеевич (RU), Адамов Григорий Васильевич (RU)*

Заявка № 2021137494
Приоритет изобретения 17 декабря 2021 г.
Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 19 апреля 2023 г.
Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 17 декабря 2041 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности



Ю.С. Зубов