

На правах рукописи



КАЛЁТА АЛЁНА АЛЕКСЕЕВНА

**ПРИРОДНЫЕ ГЛУБОКИЕ ЭВТЕКТИЧЕСКИЕ РАСТВОРИТЕЛИ В
ТЕХНОЛОГИИ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ АРАЛИИ МАНЬЧЖУРСКОЙ
(*ARALIA MANDSHURICA*)**

3.4.1 Промышленная фармацевтика и технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Санкт-Петербург
2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Шиков Александр Николаевич доктор фармацевтических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Абрамович Римма Александровна доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», начальник научно-производственного участка Медицинского научно-образовательного института

Джавахан Марина Аркадьевна доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель директора по разработке и внедрению научно-образовательного института фармации имени К. М. Лакина

Ведущая организация:

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

Защита состоится «25» марта 2025 года в 16.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г. Санкт-Петербург, вн.тер.г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте диссертационного совета (<http://dissovnet.spcpu.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 21.2.063.01,
кандидат фармацевтических наук, доцент

Орлов А.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Более половины действующих веществ лекарственных препаратов на современном фармацевтическом рынке были впервые обнаружены в лекарственных растениях, а затем ресинтезированы, модифицированы, или выделяются до сих пор из растительного сырья. В основе технологии таких препаратов лежит экстракция. Получение целевых растительных компонентов и повышение эффективности данного процесса является труднорешаемой задачей. На сегодняшний день существуют различные принципы и методы, которые позволяют увеличивать выход экстрагируемых веществ.

Часто применяемые для извлечения биологически активных веществ (БАВ) органические растворители, являются токсичными, оказывают негативное влияние на окружающую среду. В соответствии с одним из принципов «зеленой» химии в технологиях, которые сформулировали Paul T. Anastas и John Warner в 1998 году, следует избегать применения вредных вспомогательных веществ, в том числе растворителей. Данный принцип согласуется с п.2.2 требований безопасности, описанных в ГОСТ 12.1.007-76. «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности», который гласит, что мероприятия по обеспечению безопасности должны предусматривать замену вредных веществ в производстве наименее вредными. Среди приоритетов технологического развития в соответствии с Указом Президента РФ В.В. Путина от 28.02.2024 №145 «О стратегии научно-технологического развития Российской Федерации» отмечены переход к передовым технологиям проектирования и создания высокотехнологичной продукции, основанным на применении новых материалов и химических соединений, а также переход к экологически чистой и ресурсосберегающей энергетике. В соответствии с обозначенной стратегией актуален переход на нетоксичные, возобновляемые, биоразлагаемые, экономичные растворители. В 2013 году открыт новый класс природных глубоких эвтектических растворителей (Natural Deep Eutectic Solvents, NADES), которые являются многообещающими альтернативными экстрагентами. Интерес научного сообщества к данной группе растворителей растет с каждым годом, о чем свидетельствует увеличение количества публикаций о применении NADES в экстракции природных компонентов.

В 50-х годах XX века группой советских ученых под руководством академика Н.В. Лазарева была сформулирована концепция адаптогенов. В современном представлении адаптогены это категория растительных лекарственных препаратов, способствующих адаптации, устойчивости и выживанию организма в условиях стресса. Одним из представителей адаптогенов, с клинически подтвержденной фармакологической активностью, является аралия маньчжурская (*Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J. Wen). На отечественном фармацевтическом рынке зарегистрирована настойка аралии, получаемая путем экстракции корней растения с помощью 70% этилового спирта. Поиск альтернативных нетоксичных экологически безопасных экономически выгодных растворителей для экстракции аралии является актуальным.

Степень разработанности темы исследования. Пионерами в применении NADES для экстракции биологически активных веществ из растений были Y.H. Choi, J. Spronsen, Y. Dai, R. Verpoorte, et al. (2013). NADES применяли для извлечения БАВ из некоторых растений-адаптогенов, в частности, корней женьшеня ложного (L. Duan, et al., 2016), корневищ и корней элеутерококка колючего (X. Shi, et al., 2020).

Впервые в работах российских исследователей потенциал природных глубоких эвтектических растворителей для экстракции растительного сырья изучался Е.Д.

Облучинской, О.Н. Пожарицкой с соавторами (2019) на примере бурых водорослей. Н.С. Цветов с соавторами (2019) использовали эвтектические растворители для экстракции корневищ и корней родиолы розовой. Изучением применения NADES для извлечения БАВ из различного сырья занимаются А.Н. Шиков с соавторами (2020, 2021, 2023), Е.Г. Ковалева с соавторами (2020), М.А. Джавахян с соавторами (2022). В доступной для нас литературе мы не обнаружили публикаций по экстракции аралии маньчжурской с помощью природных глубоких эвтектических растворителей.

Цель и задачи исследования. Изучение особенностей применения природных глубоких эвтектических растворителей для получения извлечения из корней аралии маньчжурской.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Приготовить серию природных глубоких эвтектических растворителей с помощью различных методов, определить наилучший из них;
2. Изучить пригодность природных глубоких эвтектических растворителей для извлечения тритерпеновых сапонинов из корней аралии маньчжурской;
3. Сравнить эффективность природных глубоких эвтектических растворителей с эффективностью традиционных экстрагентов;
4. Разработать подходы к стандартизации извлечений с природными глубокими эвтектическими растворителями из корней аралии маньчжурской;
5. Оценить влияние растворителей, метода и условий экстракции на выход тритерпеновых сапонинов;
6. Сравнить способы интенсификации экстракции с природными глубокими эвтектическими растворителями и изучить их особенности.

Научная новизна исследования.

1. Впервые природные глубокие эвтектические растворители были использованы для извлечения биологически активных веществ из корней аралии маньчжурской.
2. Проведено изучение экстрагирующей способности семи NADES при мацерации по сравнению с традиционными экстрагентами. С помощью целевого метаболомного профилирования в NADES извлечениях идентифицировано двадцать тритерпеновых сапонинов (производных олеаноловой кислоты). Относительное содержание одиннадцати соединений было выше в NADES извлечениях по сравнению с водными и спиртовыми.
3. Впервые использована виброкавитационная экстракция для интенсификации процесса извлечения биологически активных веществ корней аралии маньчжурской с помощью природных глубоких эвтектических растворителей. Методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией высокого разрешения и последующим анализом главных компонент и иерархической кластеризации установлено, что NADES с холина хлоридом/яблочной кислотой (1:1) наиболее предпочтительный экстрагент, а виброкавитационный метод показал самую высокую эффективность экстракции по сравнению с мацерацией и ультразвуковой обработкой.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование направлено на изучение потенциала NADES для экстракции тритерпеновых сапонинов, что открывает новые перспективы для разработки технологий извлечения БАВ в соответствии с принципами «зеленой» химии. С использованием трех методов были приготовлены различные составы природных глубоких эвтектических растворителей. Путем оценки энергозатрат установлено, что наиболее быстрым и экологичным методом является микроволновая обработка. В работе представлены экспериментальные данные об эффективности различных составов NADES для

экстракции тритерпеновых сапонинов из корней аралии. Разработан и валидирован по основным параметрам метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для качественного и количественного анализа тритерпеновых сапонинов, который предложен для стандартизации NADES извлечений. На основании дисперсионного анализа результатов экспериментов с применением мацерации и ультразвуковой экстракции установлены закономерности влияния различных факторов на процесс извлечения суммы сапонинов из растительного сырья. Установлено, что, варьируя состав NADES, метод экстракции, температуру и время процесса, можно целенаправленно повысить содержание тритерпеновых сапонинов в NADES извлечениях с 41,5 до 85,9 мг/г. Проведено сравнение эффективности трех методов извлечения биологически активных веществ из корней аралии: мацерации с перемешиванием, ультразвуковой и виброкавитационной экстракции. Учитывая практический выход БАВ и расчетные данные по энергозатратам, виброкавитационная экстракция является наиболее предпочтительным методом. Теоретически обоснована эффективность совместного применения виброкавитационного гомогенизатора и природных глубоких эвтектических растворителей для интенсификации извлечения биологически активных веществ из сырья аралии маньчжурской.

Результаты диссертационного исследования, а именно методика проведения экстракции с использованием природных глубоких эвтектических растворителей для извлечения биологически активных веществ из корней аралии маньчжурской с ультразвуковой обработкой апробирована в научно-исследовательской группе биохимии и технологии гидробионтов лаборатории зообентоса Мурманского морского биологического института Российской академии наук (ММБИ РАН) (акт апробации от 09.09.2024 г.).

Результаты, полученные при выполнении диссертационного исследования, внедрены в научно-исследовательский процесс кафедры технологии лекарственных форм, кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (акт внедрения от 23.09.2024 г.).

Методология и методы исследования. Исследование проводилось на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации в период с 2021 года по 2024 год. Часть работ была выполнена в рамках сотрудничества с федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

В ходе исследования применяли современные физико-химические методы анализа, такие как спектрометрия в инфракрасной области, высокоэффективная жидкостная хроматография, ультравысокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией высокого разрешения. Экспериментальная часть базировалась на рекомендациях Государственной Фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) XIV и XV изданий.

Степень достоверности и апробация полученных результатов. Для достижения достоверности получаемых результатов эксперименты проводили в трех повторностях. В ходе работы использовали аттестованные и поверенные приборы, оборудование.

Основные результаты работы были представлены на рассмотрение и обсуждение на международных конференциях: The 5th и 6th «The Belt and Road» International Conference on Traditional Medicine & Symposium on Traditional Chinese Medicine (Китай, 2022, 2023), XXIV Международном съезде «Фитофарм» (2023), XII, XIII, XIV Всероссийской конференции

студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2022, 2023, 2024).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Сравнение различных методов приготовления природных глубоких эвтектических растворителей;
2. Оценка пригодности природных глубоких эвтектических растворителей для извлечения тритерпеновых сапонинов из корней аралии маньчжурской;
3. Сравнение эффективности природных глубоких эвтектических растворителей с традиционными экстрагентами для извлечения тритерпеновых сапонинов из корней аралии маньчжурской;
4. Разработка и валидация методики качественного и количественного анализа сапонинов с применения высокоэффективной жидкостной хроматографии;
5. Оценка влияния состава растворителей, метода и условий экстракции на выход тритерпеновых сапонинов;
6. Сравнение методов интенсификации процесса экстракции биологически активных веществ из аралии маньчжурской.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с приоритетами технологического развития, утвержденные Указом Президента РФ В.В. Путина от 28.02.2024г. №145 «О стратегии научно-технологического развития Российской Федерации», приоритетными направлениями научно-технологического развития, утвержденными Указом Президента РФ В.В. Путина от 18.06.2024г. №529 «Об утверждении приоритетных направлений научно-технологического развития и перечня важнейших наукоемких технологий», а также с планом научно-исследовательских работ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов. Поиск, систематизация, обобщение литературных данных, подготовка и осуществление экспериментальной работы на всех этапах, анализ полученных результатов, их статистическая обработка и интерпретация, а также написание научных публикаций, оформление диссертации выполнены лично автором. Доля участия во всем объеме проведенной работы составляет не менее 90%.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств, а именно 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.

Публикации материалов исследования. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, среди которых 2 статьи в изданиях, включенных в международные базы Scopus и Web of Science.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 202 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 35 рисунками и 25 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, экспериментальной части (главы 3-6), заключения и списка литературы, включающего 177 источников (из которых 142 источника зарубежной литературы), приложения 1-3.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В литературном обзоре приведены ботаническое описание аралии маньчжурской, химический состав, экспериментально установленная фармакологическая активность соединений, рассмотрены препараты на основе данного растения. Обсуждены методы и основные аспекты теории экстрагирования лекарственного растительного сырья. Охарактеризованы природные глубокие эвтектические растворители как новый класс «зеленых» экстрагентов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись корни аралии маньчжурской (*Araliae elatae radices*) (ГФ XIV ФС.2.5.0058.18 Аралии маньчжурской корни) семейства Аралиевые (*Araliaceae*). Сырье было поставлено фирмой «Женьшень» (серия 0051-51) в 2021 году. Сырье соответствовало требованиям ГФ РФ XIV издания.

Для получения природных глубоких эвтектических растворителей использовали: холина хлорид (98%, НеваРеактив, Россия, Hefei July Biotechnology Co., Ltd, Китай), щавелевую кислоту (99%, НеваРеактив, Россия), D-сорбит (98%, НеваРеактив, Россия), D,L-яблочную кислоту (98%, НеваРеактив, Россия), L-рамнозу (99%, Sigma-Aldrich, США), L-молочную кислоту (80%, InnoGreenChem B.V., Нидерланды). Для проведения анализов были использованы реактивы: спирт этиловый 96,4% (Вектон, Россия); класса «для ВЭЖХ» – вода, ацетонитрил (Merck KGaA, Германия; Honeywell Riedel-de Haen, Германия; Вектон, Россия), аммония формиат (Merck KGaA, Германия; Sigma-Aldrich, США), муравьиная кислота (Merck KGaA, Германия), трифторуксусная кислота (ТФУ) (Вектон, Россия); стандартный образец – аралозид А CAS-7518-22-1 ($\geq 99\%$, SNC International Co., Limited, Китай). Вода для проведения ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (УВЭЖХ-МС) очищалась на системе водоподготовки и очистки Barnstead GenPure Pro UV-TOC (Thermo Fisher Scientific, Швеция).

Перед экстракцией сырье измельчали с помощью роторной ножевой мельницы РМ 120 (ООО «Вибротехник», Россия) до частиц, проходящих сквозь сито лабораторной просеивающей машины Cisa RP 200N (Cisa, Испания) с необходимым размером. Для приготовления NADES использовали весы лабораторные электронные CE612-C (ООО «Сартогосм», Россия), магнитную мешалку с подогревом ММ-5 (ООО «Гранат», Россия), микроволновую печь Rolsen MG2080SN (Rolsen, Россия), ультразвуковую ванну УЗВ-2,8 (ООО «Сапфир», Россия), термостат IB-15G (Jeio Tech, Южная Корея). Для получения извлечений использовали весы аналитические CE224-C (ООО «Сартогосм», Россия), магнитную мешалку с подогревом LMS-2003D (Daihan Labtech, Южная Корея), плитку нагревательную ES-HS3030M (ООО «Экросхим», Россия), ультразвуковую ванну УЗВ-2,8 (ООО «Сапфир», Россия), виброкавитационный гомогенизатор (лабораторный образец аппарата, разработанный в СПбГТУ (ТИ)), роторный испаритель Hei-Var Advantage ML/G3B (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия), микроцентрифугу 5415R (Eppendorf, Германия), центрифугу лабораторную MPW-351 (MPW Med. Instruments, Польша), лиофильную сушилку FreeZone 2.5 (Labconco, США).

ИК-спектрометрию с Фурье-преобразованием проводили на приборе Spectrum 3 Tri-Range FT-IR Spectrometer (PerkinElmer, США), визуализацию спектров осуществляли с помощью SpectraGryph (версия 1.2.16.1, Германия). Оценка изменения вязкости проводилась на ротационном вискозиметре Brookfield DV-III Ultra (Brookfield Engineering Laboratories Inc, США), программное обеспечение – RheocalcT (АМТЕК Brookfield, США). Анализ извлечений осуществляли при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu Corporation, Япония) с диодно-матричным детектором SPD-M20A (Shimadzu Corporation, Япония). Обработку результатов анализа осуществляли с помощью LabSolution (Shimadzu Corporation, Япония), Origin 2022 (OriginLab Corporation, США). Целевой метаболомный анализ проводили при помощи обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии в системе Waters ACQUITY UPLC I-Class UPLC System (Waters GmbH, Германия) и квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометром TripleTOF 6600 (ABSciex, Германия) с электроспреей ионизацией. Нецелевой анализ метаболитов проводили при помощи обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии в системе Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Германия), сопряженной с тандемной масс-спектрометрией в гибридном масс-анализаторе LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Германия), основанном на комбинации электродинамической и орбитальной ионных ловушек в режиме отрицательно заряженных квази-молекулярных ионов.

Статистическая обработка

Все результаты измерений обрабатывали в соответствии с подходами, описанными в ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» ГФ РФ XV издания. В качестве программного обеспечения для статистической обработки результатов экспериментов использовали GraphPad Prism (версия 9.0.0, США), Microsoft Excel (версия 2016 года, США), Metaboanalyst 5.0 (Wishart Research Group, Канада), STATGRAPHICS (Centurion XV, США).

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ЭНЕРГОЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРИРОДНЫХ ГЛУБОКИХ ЭВТЕКТИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Мы сравнили три метода приготовления NADES: нагревание с перемешиванием (А), ультразвуковая (Б) и микроволновая обработка (В). Рассчитанные количества донора и акцептора водородной связи (таблица 1) помещали в плоскодонную колбу, перемешивали с помощью стеклянной палочки и готовили с помощью вышеуказанных методов. Суммарная масса составляла 20,0 г. Полученные образцы растворителей хранили в течение 48 часов при комнатной температуре. Данные о стабильности приведены в таблице 1.

Таблица 1. Составы природных глубоких эвтектических растворителей, приготовленных в ходе работы

Шифр состава	Акцептор водородных связей	Донор водородных связей	Молярное соотношение	Результат после приготовления методом А	Результат после приготовления методом Б	Результат после приготовления методом В
НД1	Холин хлорид	Молочная кислота	1:1	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость
НД2	Холин хлорид	Молочная кислота	1:2	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость
НД3	Холин хлорид	Молочная кислота	1:3	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость
НД3.30	Холин хлорид	Молочная кислота	1:3 + 30% воды	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость
НД4	Холин хлорид	Яблочная кислота	1:1	гомогенная вязкая жидкость	гомогенная вязкая жидкость	гомогенная вязкая жидкость

Шифр состава	Акцептор водородных связей	Донор водородных связей	Молярное соотношение	Результат после приготовления методом А	Результат после приготовления методом Б	Результат после приготовления методом В
НД5	Холин хлорид	Яблочная кислота	1:2	гомогенная вязкая жидкость	гомогенная вязкая жидкость	гомогенная вязкая жидкость
НД6	Холин хлорид	Щавелевая кислота	1:1	гомогенная жидкость (после обработки в термостате при 100°C)	гомогенная жидкость (после обработки в термостате при 100°C)	гомогенная жидкость
НД6.15	Холин хлорид	Щавелевая кислота	1:1 + 15% воды	гомогенная жидкость (после обработки в термостате при 100°C)	гомогенная жидкость (после обработки в термостате при 100°C)	гомогенная жидкость
НД7	Холин хлорид	Щавелевая кислота	1:2	не стабилен	не стабилен	не стабилен
НД8	Холин хлорид	Лимонная кислота	1:1	гомогенная вязкая субстанция	гомогенная вязкая субстанция	гомогенная вязкая субстанция
НД9	Холин хлорид	Лимонная кислота	1:2	гомогенная вязкая субстанция	гомогенная вязкая субстанция	гомогенная вязкая субстанция
НД10	Холин хлорид	Сорбит	1:2	не стабилен	не стабилен	не стабилен
НД11	Холин хлорид	Рамноза	2:1	не стабилен	не стабилен	стабилен только в течение 3-4 дней
НД12	Сорбит	Молочная кислота	1:1	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость
НД13	Сорбит	Молочная кислота	1:2	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость
НД14	Сорбит	Яблочная кислота	1:1	гомогенная вязкая субстанция	гомогенная вязкая субстанция	гомогенная вязкая субстанция
НД14.10	Сорбит	Яблочная кислота	1:1 + 10% воды	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость
НД15	Сорбит	Яблочная кислота	1:2	гомогенная вязкая субстанция	гомогенная вязкая субстанция	гомогенная вязкая субстанция
НД15.20	Сорбит	Яблочная кислота	1:2 + 20% воды	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость	гомогенная жидкость
НД16	Сорбит	Щавелевая кислота	1:1	гомогенная жидкость (после обработки в термостате при 100°C)	гомогенная жидкость (после обработки в термостате при 100°C)	гомогенная жидкость
НД17	Сорбит	Щавелевая кислота	1:2	не стабилен	не стабилен	не стабилен
НД18	Сорбит	Лимонная кислота	1:1	гомогенная вязкая субстанция (после обработки в термостате при 100°C)	гомогенная вязкая субстанция (после обработки в термостате при 100°C)	гомогенная вязкая субстанция
НД19	Сорбит	Лимонная кислота	1:2	гомогенная вязкая субстанция (после обработки в термостате при 100°C)	гомогенная вязкая субстанция (после обработки в термостате при 100°C)	гомогенная вязкая субстанция

В некоторых случаях (составы НД6, НД16, НД18, НД19) с помощью метода нагревания с перемешиванием при температуре 80-90°C не удалось получить однородную смесь. В составах НД7, НД10, НД11, НД17 при хранении в течение 48 часов наблюдали кристаллизацию компонентов. Эти составы были исключены из дальнейших исследований. Метод приготовления NADES не оказывал влияния на структуру растворителя. Растворители,

приготовленные разными методами, не отличались по внешнему виду и их типичные ИК-спектры были идентичны.

Время приготовления NADES с помощью микроволновой обработки уменьшается с 4 часов до 4 минут, а энергозатраты уменьшаются в 30-180 раз по сравнению с методами нагревания с перемешиванием и ультразвуковой обработки. Следовательно, данный метод является ресурсосберегающим и наиболее предпочтительным для приготовления NADES.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ПРИГОДНОСТИ ПРИРОДНЫХ ГЛУБОКИХ ЭВТЕКТИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ САПОНИНОВ

Учитывая актуальность перехода на «зеленые» энергосберегающие технологии, мы оценили возможность применения NADES для извлечения тритерпеновых сапонинов – основного класса биологически активных веществ аралии маньчжурской.

Для принципиальной оценки возможности извлечения тритерпеновых сапонинов с помощью природных глубоких эвтектических растворителей мы использовали составы НДЗ, НДЗ.30, НД4, НД5, НД6.15, НД14.10, НД15.20, указанные в таблице 1. Извлекающую способность NADES сравнивали с извлекающей способностью полярного растворителя (воды) и липофильного растворителя (96,4% этилового спирта). Состав БАВ растений описывается его «метаболомом». Условно метаболомное профилирование можно подразделить на два подхода: «целевая» метаболомика, которая предусматривает анализ известных веществ, и «нецелевая» метаболомика, включающая анализ известных и неизвестных метаболитов. Для проведения целевого анализа, на основании литературных данных, мы подготовили список тритерпеновых сапонинов, ранее выделенных и идентифицированных в растениях рода *Aralia*, сгруппированные в зависимости от изначального агликона (сапогенина). Все полученные извлечения анализировали с помощью обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии и квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометром с электроспрей ионизацией.

Тритерпеновые сапонины, идентифицированные в извлечениях

На основании характерных особенностей фрагментации и исключения ложноположительных результатов, связанных с фрагментацией в источнике, подтвердили наличие 20 метаболитов этого класса в извлечениях корня аралии маньчжурской (таблица 2).

Таблица 2. Наличие идентифицированных соединений в различных извлечениях

№	Идентифицированные соединения	Наличие в растворителе								
		Вода	Этанол	НДЗ*	НДЗ.30*	НД4*	НД5*	НД6.15*	НД14.10*	НД15.20*
1	Гуаиацин Б изомер 1	+	+	+	+	+	+	н/о	+	+
2	Олеаноловая кислота-3-О-(триглюкопиранозил-1-3-арабинопиранозил)-28-1-глюкопиранозил	+	+	+	+	+	+	н/о	+	+
3	Калопанакс-сапонин F изомер 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	Календулагликозид А	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Аралияармозид	+	+	+	+	+	+	н/о	+	+
6	Калопанакс-сапонин F изомер 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Календулагликозид С изомер 1	+	+	+	н/о	+	+	н/о	+	+
8	Эфир олеаноловой кислоты-3-О-(диглюкопиранозил-1-3-	н/о*	+	+	+	+	+	н/о	+	+

	арабинопиранозил)-28-1- глюкопиранозила									
9	Эфир олеаноловой кислоты-3- <i>O</i> - (метилдиокси- тригексопиранозил-1-3- пентопиранозил)-28-1- гексопиранозила	+	+	+	+	+	+	н/о	+	+
10	Аралозид В	+	+	+	+	+	+	н/о	+	+
11	Аралиясапонин III	+	+	+	+	+	н/о	н/о	+	+
12	Эфир олеаноловой кислоты-3- <i>O</i> -(гексозил)- 28-1-гексоурионида изомер 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	Календулагликозид С изомер 2	+	+	+	+	+	+	н/о	+	+
14	Аралозид А изомер 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	Гуаиацин Б изомер 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	Аралозид А изомер 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	Неизвестное производное олеаноловой кислоты	+	+	+	+	+	+	н/о	+	+
18	Эфир олеаноловой кислоты-3- <i>O</i> -(гексозил)- 28-1-гексоурионида изомер 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	Олеаноловая кислота 3- <i>O</i> - гексурионид-(1-3- пентафуранозид)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	Гуаиацин Б изомер 3	+	+	+	+	+	+	н/о	+	+

*Обозначения: НД3 – холин хлорид-молочная кислота (1:3), НД3.30 – холин хлорид-молочная кислота (1:3+30% воды), НД4 – холин хлорид-яблочная кислота (1:1), НД5 – холин хлорид-яблочная кислота (1:2), НД6.15 – холин хлорид-щавелевая кислота (1:1+15% воды), НД14.10 – сорбит-яблочная кислота (1:1+10% воды), НД15.20 – сорбит-яблочная кислота (1:2+20% воды); н/о – не обнаружено.

Практически все идентифицированные тритерпеновые сапонины были обнаружены как в NADES, так и в водном и спиртовом извлечениях (таблица 2). Соединение **8** не детектировали в водном извлечении, соединение **7** – в составе НД3.30, соединение **11** – в составе НД5. В составе НД6.15 были обнаружены только соединения **3, 4, 6, 12, 14, 15, 16, 18, 19**.

Результаты сравнения извлекающей способности природных глубоких эвтектических растворителей, воды и этилового спирта

Следует отметить, что экстрагирующая способность воды, спирта и природных глубоких эвтектических растворителей различалась. Наиболее широкий спектр тритерпеновых сапонинов обнаружили в составах НД3 (холина хлорид – молочная кислота 1:3), НД4 (холина хлорид – яблочная кислота 1:1), НД14.10 (сорбит – яблочная кислота 1:1 + 10% воды) и НД15.20 (сорбит – яблочная кислота 1:2 + 20 % воды).

Для сравнения относительного количества отдельных тритерпеновых сапонинов в различных NADES проведена нормализация по интенсивности пиков соответствующих соединений в водных и спиртовых извлечениях. Относительные количества тритерпеновых сапонинов, обнаруженных в каждом NADES извлечении, выражены в виде кратных изменений (*fold changes, FC*) по сравнению с водными и спиртовыми извлечениями корней аралии маньчжурской (рис. 1). Кратность изменения, превышающая единицу, указывала на лучшее извлечение, полученное с NADES.

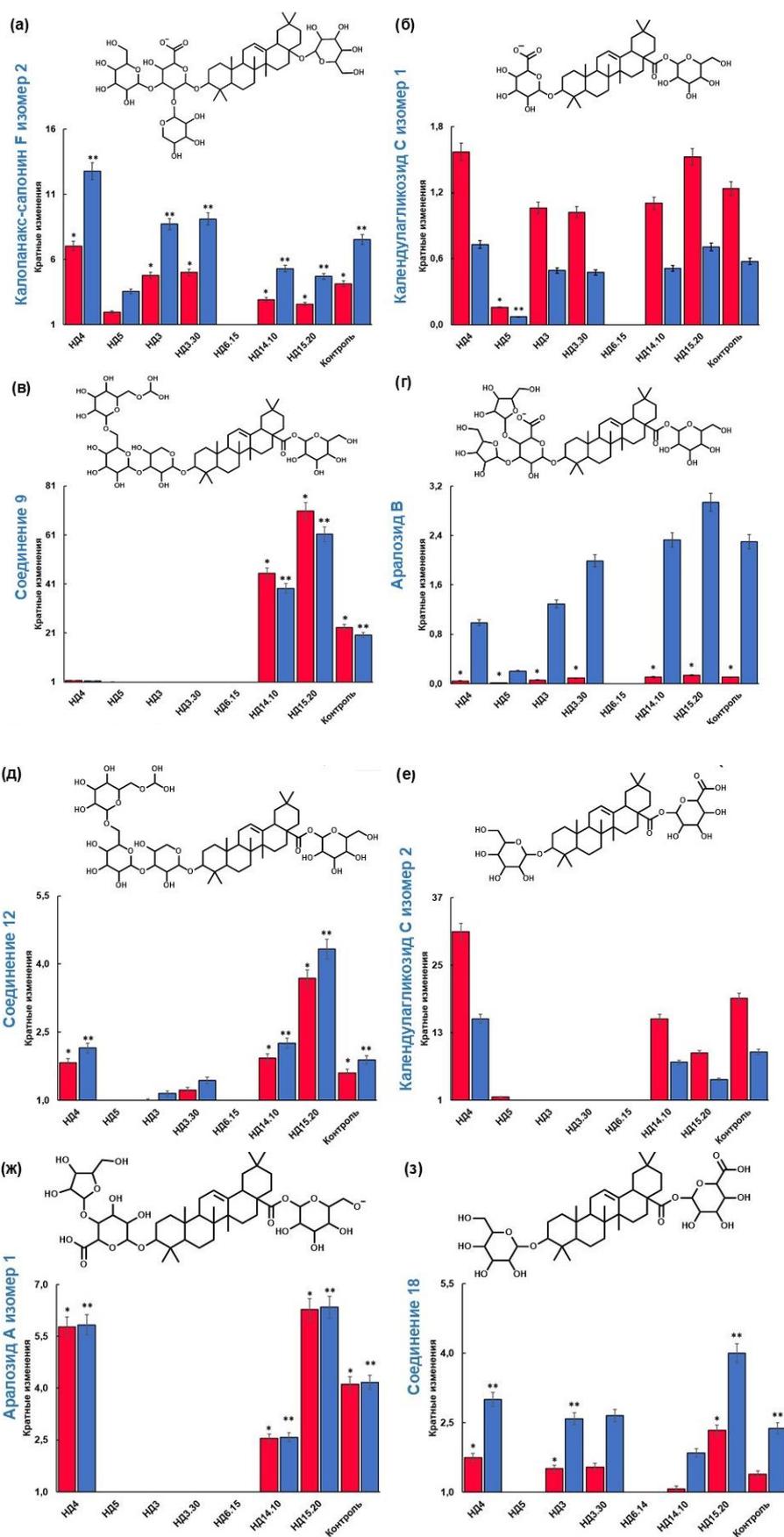


Рисунок 1 - Структуры и относительная степень извлечения соединений **6** (а), **7** (б), **9** (в), **10** (г), **12** (д), **13** (е), **14** (ж) и **18** (з), выраженная в виде кратных изменений по сравнению с теми, которые наблюдаются в водных (красные) и спиртовых (синие) извлечениях. Нумерация соединений указана в таблице 2. *—статистически значимое значение по сравнению с водным извлечением ($p \leq 0,05$); **—

статистически значимое значение по сравнению со спиртовым извлечением ($p \leq 0,05$) (соединения 8, 16, 19 не указаны)

Интересно, что NADES оказались более эффективными растворителями для экстракции одиннадцати тритерпеновых сапонинов, по сравнению с водой и спиртом. Относительные содержания соединений **6–10, 12–14, 16, 18** и **19** были выше в NADES извлечениях (таблица 2, рис. 1). Наибольшее относительное содержание соединений **6, 7, 13, 19** было обнаружено при применении растворителя холина хлорида и яблочной кислоты (НД4) в соотношении 1:1 (рис. 1 а,б,е). А наибольшее относительное содержание соединений **8, 9, 10, 12, 14, 16, 18** было обнаружено при применении растворителя сорбита и яблочной кислоты (НД15.20) в соотношении 1:2 с добавлением 20% воды (рис. 1 в,г,д,ж,з). Наблюдаемое высокое извлечение тритерпеновых сапонинов в NADES можно объяснить близкими значениями рН (2,26 для НД4 и 3,84 для НД3.30) к рКа олеаноловой кислоты (4,74) – агликона всех обнаруженных тритерпеновых сапонинов.

Экстракционная способность NADES в отношении отдельных тритерпеновых сапонинов существенно различалась (рис. 1), что во многом можно объяснить различиями в структуре аналитов. Более того, на это явление также влияет изомерия. Например, распределение относительного содержания двух изомеров календулагликозида С в извлечениях (рис. 1 б, е) четко отличались друг от друга. Также очевидно, что разные типы NADES обладают разным сродством к тритерпеновым сапонином аралии маньчжурской. Очевидно, что и структура отдельных компонентов NADES извлечений, их соотношение и степень сольватации напрямую влияют на взаимодействие молекул растворителя и целевых тритерпеновых сапонинов.

Результаты данного эксперимента доказывают перспективу замены воды и спирта нетоксичными «зелеными» природными глубокими эвтектическими растворителями для экстракции тритерпеновых сапонинов из корней аралии маньчжурской. Важно отметить, что применение NADES не только дает возможность повысить эффективность экстракции, но также обеспечивает стабильность получаемых извлечений. Такое свойство можно объяснить низким рН, высокой вязкостью, наличием в структуре эвтектических растворителей дополнительных гидроксильных и карбоксильных групп, которые легко участвуют в образовании водородных связей с тритерпеновыми сапонином. Тогда как водные извлечения склонны к микробной контаминации и поэтому имеют ограниченный срок хранения.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОСТАВА РАСТВОРИТЕЛЕЙ, МЕТОДА И УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ВЫХОД ТРИТЕРПЕНОВЫХ САПОНИНОВ

В главе 4 мы впервые показали способность NADES извлекать тритерпеновые сапонины. Для экстракции мы использовали метод мацерации с перемешиванием и нагреванием. Учитывая высокую вязкость NADES, необходима интенсификация процесса экстракции. Одним из широко используемых методов интенсификации для извлечения БАВ с помощью природных глубоких эвтектических растворителей является ультразвуковая экстракция. В ряде случаев УЗЭ способствует увеличению выхода целевых биоактивных компонентов, что делает его привлекательным методом для экстракции с применением NADES. Однако, закономерности экстракции тритерпеновых сапонинов (ТС) из корней аралии не изучены.

Для оценки качественных и количественных характеристик получаемых извлечений необходимо было разработать методику анализа. Поскольку основными действующими веществами аралии, по которым производится стандартизация ЛРС и настойки аралии в РФ, является сумма аммонийных солей аралозидов А, В и С, для оценки эффективности

экстракции корней аралии маньчжурской мы использовали суммарное содержание тритерпеновых сапонинов в пересчете на аралозид А. Хроматографирование проводили с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония), оснащенного диодно-матричным детектором SPD-M20A (Shimadzu, Япония). Разделение проводили на колонке Supelcosil C18 (250 x 4,6 x 5 мкм) (Supelcosil, Германия). В качестве подвижной фазы были выбраны смесь 0,1% ТФУ в воде (фаза А) и 0,1% ТФУ в ацетонитриле (фаза В). Разделение проводили в градиентном режиме: 0 мин, 5% В; 1-10 мин, 20% В; 11-25 мин, 28% В; 26-35 мин, 33% В; 36-45 мин, 38% В; 46-55 мин, 46% В; 56-60 мин, 60% В; 61-68 мин, 75% В; 69-75 мин, 5% В, при скорости подвижной фазы 0,8 мл/мин и температуре колонки 30 °С.

Валидация методики проводилась в соответствии с «ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик» по следующим параметрам: специфичность, линейность, аналитическая область, прецизионность, правильность, предел количественного определения. Время удерживания аралозидов А на хроматограммах СО и NADES извлечения совпадают (52,2 мин). На хроматограммах растворителей не обнаружены пики в области нахождения целевого аналита. Методика количественного определения валидирована в диапазоне концентраций от 0,008 до 0,048 мг/мл (коэффициент корреляции $r = 0,9998$), открываемость – от 98,0 до 101,1%, коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение) – 1,54%, предел количественного определения – 0,004 мг/мл. В связи с тем, что использование в рутинном анализе дорогостоящих стандартов всех аралозидов не рационально, сумму сапонинов корней аралии определяли по сумме площадей пиков соединений со временем удерживания от 48,0 до 55,0 мин.

В соответствии с результатами эксперимента, описанного в главе 4, для извлечения тритерпеновых сапонинов аралии применяли растворители НД4 и НД14. Для оценки возможных взаимодействий между компонентами растворителей, структурных изменений, а также подтверждения образования водородных связей между акцептором и донором использовалась ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием. Сравнивая спектры NADES со спектрами исходных компонентов, можно отметить, что спектр NADES представляет собой перекрытие двух других спектров с небольшими различиями. На спектрах NADES появляется широкая полоса при 3329 см^{-1} (для растворителя НД4), 3390 см^{-1} (для растворителя НД14), которая соответствует растяжению валентных плоскостных колебаний –ОН группы, что подтверждает образование водородных связей. Мацерацию проводили на магнитной мешалке с подогревом. Ультразвуковую экстракцию проводили с помощью ультразвуковой ванны. Соотношение сырье:экстракт составляло 1:25 (по массе).

Для многофакторного эксперимента по изучению влияния условий экстракции на выход ТС из корней аралии выбрали качественные факторы: тип NADES (фактор А на двух уровнях: а1 – НД4 и а2 – НД14), метод экстракции (фактор В на двух уровнях: b1 - мацерация и b2 – УЗЭ). Количественными факторами были температура экстракции (фактор С на двух уровнях: с1 - 45 °С и с2 - 60 °С) и время экстракции (фактор D на семи уровнях: от 10 до 100 мин). Выходным параметром служило содержание суммы ТС в пересчете на аралозид А в полученном NADES извлечении.

Все измерения выполнены не менее чем в трехкратной повторности. Для полученных данных были подсчитаны среднее значение и стандартное отклонение (SD). Для оценки данных использовали критерий Стьюдента, однофакторный или многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с повторными измерениями, в случае обнаружения достоверного влияния исследуемого фактора последующие межгрупповые сравнения (post hoc

analysis) были проведены с использованием критерия Фишера (Fisher LSD). Для анализа данных, имеющих не более двух сравниваемых групп, использовали критерий Стьюдента (t-критерий). Различия были определены при 0,05 уровне значимости.

Методом дисперсионного анализа результатов экспериментов установлено, что контролируемые факторы (тип NADES, метод и температура экстракции) оказывают статистически значимое влияние на выход ТС из корней аралии (таблица 3).

Таблица 3. Дисперсионный анализ экспериментальных данных по экстрагированию ТС в пересчете на аралозид А в NADES извлечениях

Источник дисперсии	Суммы квадратов (SS)	Df	F-Ratio	P-Value
Главные эффекты				
Фактор А	665,45	1	8,90	0,0033
Фактор В	18690,90	1	249,94	0,0000
Фактор С	20229,40	1	270,51	0,0000
Фактор D	9263,07	6	20,64	0,0000
Остаток	11815,60	158		
Общая сумма	60664,60	167		

Известно, что некоторые тритерпеновые сапонины могут быть термически неустойчивы. С. Н. Борисенко и соавторы (2009) показали, что при экстракции в среде субкритической воды аралозиды подвергаются воздействию высоких температур и давлений, данный процесс может сопровождаться изомеризацией или окислительно-восстановительными реакциями агликона. Многочисленные исследования показывают, что применение УЗЭ для растительного сырья позволяет увеличить выход биологически активных веществ. Однако, при определенных условиях УЗЭ может приводить к деградации БАВ, например, фукоидана, флавоноидов и тритерпенов. Для повышения выхода и сохранности БАВ достаточно кратковременного воздействия ультразвуковых волн. Учитывая вышеизложенное, было проведено изучение влияния времени экстракции корней аралии с помощью двух NADES. Как правило, более высокая эффективность экстракции достигается с увеличением времени экстракции. Чтобы оптимизировать время экстракции, корни аралии экстрагировали при нагревании и использовании ультразвука в течение 10 – 100 мин с использованием растворителей НД4 и НД14. Результаты анализа количественного содержания целевой группы БАВ в зависимости от длительности воздействия ультразвука в сравнении с мацерацией приведены на рис. 2 и 3. Увеличение температуры экстракции до 60 °С способствовало некоторому уменьшению выхода ТС (рис. 2), что, вероятно, связано с увеличением скорости деструкции молекул сапонинов.

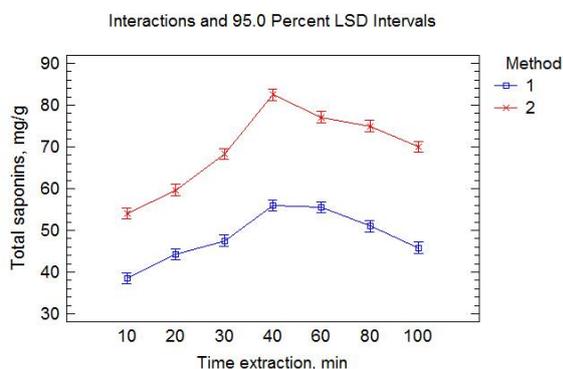


Рисунок 2 – Содержание тритерпеновых сапонинов (мг/г) в зависимости от времени при мацерации (1), при ультразвуковом воздействии (2)

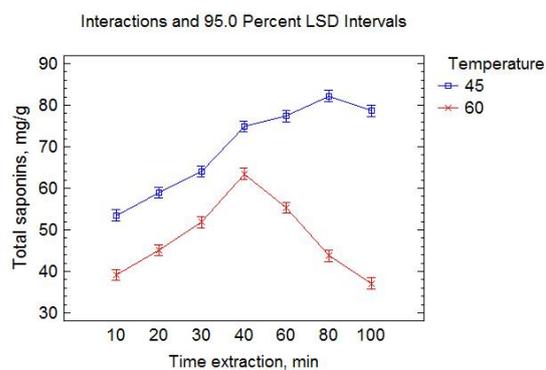


Рисунок 3 – Содержание тритерпеновых сапонинов (мг/г) в зависимости от времени ультразвуковой обработки при температуре 45 °С и 60 °С

Результаты, представленные на рис. 2 и 3 показали, что эффективность экстракции ТС аралии увеличивается с увеличением времени экстракции с 10 до 40 минут. Однако при дальнейшем увеличении времени мацерации (метод 1) или воздействия ультразвука (метод 2) эффективность экстракции статистически значимо снижалась. Таким образом, варьируя указанные факторы содержание ТС в NADES извлечениях увеличивалось с 41,5 мг/г при мацерации (нагрев до 60 °С) до 85,9 мг/г при низкотемпературной (45 °С) УЗЭ.

ГЛАВА 6. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ АРАЛИИ

В главе 4 мы впервые доказали возможность извлечения тритерпеновых сапонинов из корней аралии маньчжурской с применением природных глубоких эвтектических растворителей. Однако спектр биологически активных веществ аралии значительно шире. Согласно данным литературного обзора, в растении идентифицировано около 300 активных метаболитов. Учитывая возможность NADES извлекать как гидрофильные, так и липофильные соединения, представляло интерес провести нецелевой анализ метаболитов аралии, извлекаемых с помощью нового класса экстрагентов. Экстрагирование корней аралии маньчжурской проводили растворителями НД4 (холина хлорид – яблочная кислота в молярном соотношении 1:1) и НД14.10 (сорбит – яблочная кислота 1:1 + 10% воды) методами мацерации с перемешиванием, ультразвуковой (УЗЭ) и виброкавитационной (ВКЭ) обработки. Метаболомное профилирование извлечений из корней аралии проводили в режиме регистрации отрицательно заряженных квази-молекулярных ионов с помощью обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с тандемной масс спектрометрией в гибридном масс-анализаторе, основанном на комбинации электродинамической и орбитальной ионных ловушек. Схема эксперимента представлена на рис. 4.

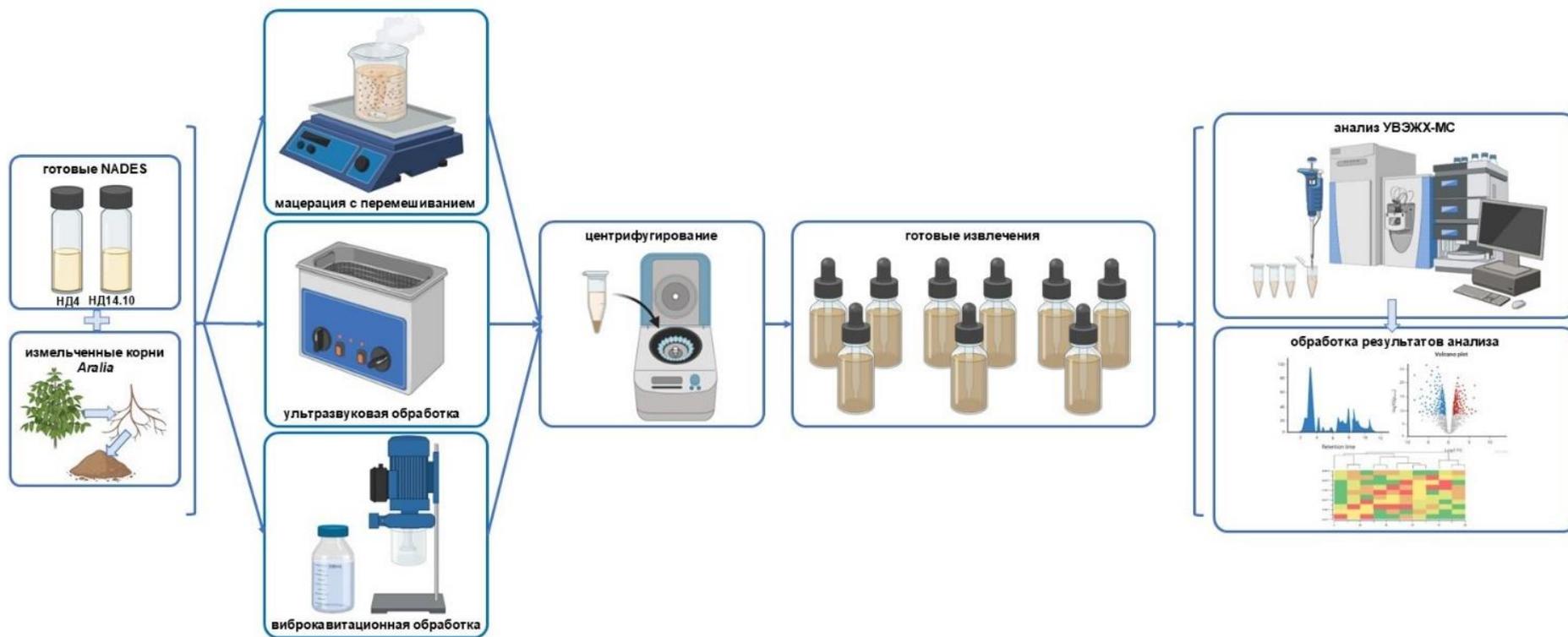


Рисунок 4 – Схема проведения эксперимента (создано с помощью <https://app.biorender.com/>)

На первом этапе сравнивались три метода экстракции (мацерация с перемешиванием, УЗЭ и ВКЭ), применяемые к каждому NADES индивидуально. Для извлечений, полученных с помощью растворителей НД4 и НД14.10, анализ методом главных компонент (principal component analysis, PCA) выявил 58,8% и 33,2%, а также 59,7% и 30,4% от общей дисперсии, объясняемых главными компонентами 1 (PC1) и 2 (PC2) соответственно, что указывает на четкое разделение между тремя различными методами экстракции.

На втором этапе мы исследовали между собой относительные эффективности NADES при каждом из методов экстракции.

Сравнение эффективности NADES в качестве экстрагентов

Анализ методом главных компонент уровней содержания метаболитов показал четкое разделение для двух групп извлечений, полученных с НД4 и НД14.10 при мацерации. Так, при сравнении анализ выявил 86,5% и 9,4% от общей дисперсии, объясняемых главными компонентами 1 (PC1) и 2 (PC2) соответственно (рис. 5 а). С помощью иерархического кластерного анализа (hierarchical clustering analysis, HCA) мы получили тепловые карты, отражающие нормализованные относительные содержания отдельных метаболитов. Несмотря на наличие внутригрупповой вариабельности в группе извлечений с растворителем НД14.10, анализ показал относительно низкий уровень внутригрупповой дисперсии и четкое разделение двух групп, что заметно по раздельной кластеризации (рис. 5 б). В рамках эксперимента получали среднюю пробу (пробу сравнения) путем смешивания всех образцов извлечений. Самый теплый тон на карте обозначает содержание метаболита в контролируемой пробе в 2 раза больше, чем в средней, а самый холодный тон обозначает, что содержание контролируемого компонента в 2 раза ниже, чем в средней пробе. Цифрами 1,2,3 на рисунках 5-13 обозначены три повторности эксперимента. Для более детального изучения метаболического профиля, связанного с выбором растворителя, мы исследовали парные сравнения между отдельными группами извлечений с растворителями НД4 и НД14.10. Сравнение по t-критерию с представлением в виде volcano plot (с поправкой на коэффициент ложного обнаружения (False Discovery Rate, FDR) с использованием критерия Бенджамини-Хохберга (Benjamini-Hochberg method) при $p \leq 0,05$) выявило 105 метаболитов, демонстрирующих кратные изменения уровня содержания $FC \geq 2$. Цветные точки обозначают метаболиты, демонстрирующие относительное содержание со статистически значимыми различиями по сравнению со средней пробой. При этом синими точками обозначены метаболиты с повышенным содержанием в извлечениях, полученных с растворителем НД14.10; красные точки указывают на метаболиты с повышенным содержанием в извлечениях, полученных с растворителем НД4. Метаболиты, обозначенные серыми точками, не показали статистически значимых различий. Содержание 38 метаболитов было выше в растворителе НД14.10 и 67 метаболитов – в НД4 (рис. 5 в).

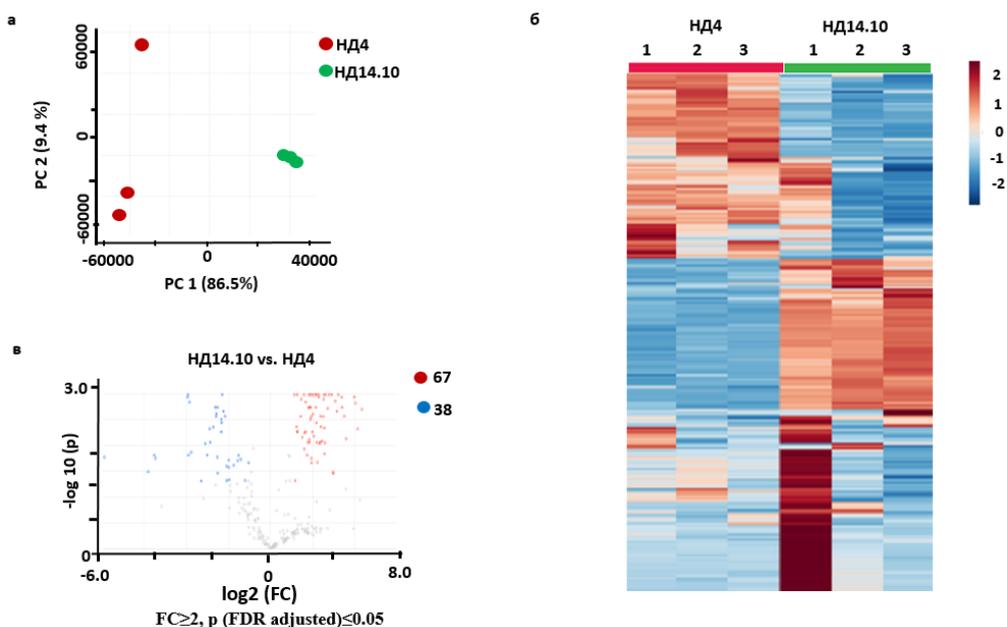


Рисунок 5 – Сравнение профилей вторичных метаболитов корней аралии маньчжурской, извлеченных методом мацерации с НД4 и НД14.10: результаты анализа главных компонент (РСА) с графиком оценок (а), тепловая карта (б) и volcano plot (в)

Анализ РСА уровней содержания, выполненный для извлечений, полученных с использованием растворителей НД4 и НД14.10 методом УЗЭ, показал четкое разделение между извлечениями. Так, при сравнении анализ выявил 79,2% и 9,2% от общей дисперсии, объясняемых главными компонентами 1 (PC1) и 2 (PC2) соответственно (рис. 6 а). Иерархический кластерный анализ свидетельствует об относительно низком уровне внутригрупповой дисперсии, а также четком разделении и независимой кластеризации по метаболитам в извлечениях (рис. 6 б). По результатам t-теста с представлением volcano plot 60 и 73 метаболита, демонстрирующие кратные изменения уровня содержания $FC \geq 2$, были более эффективно извлечены с помощью НД4 и НД14.10 соответственно (рис. 6 в).

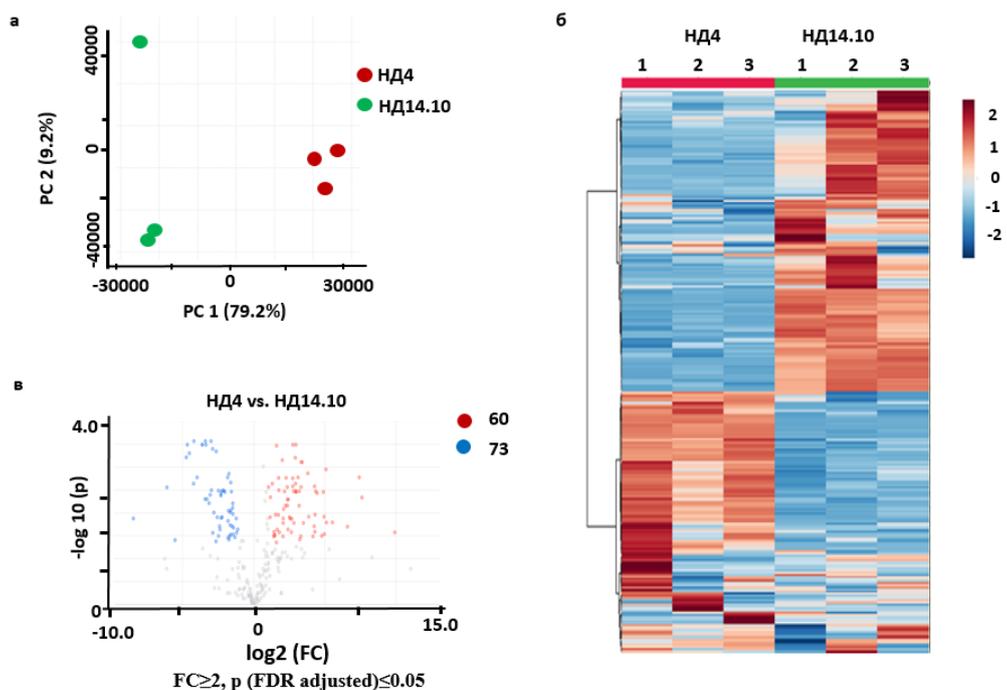


Рисунок 6 – Сравнение профилей вторичных метаболитов корней аралии маньчжурской,

экстрагированных при УЗЭ, с НД4 и НД14.10: результаты анализа главных компонент (PCA) с графиком оценок (а), тепловая карта (б), и volcano plot (в)

Данные PCA уровней содержания в группах извлечений с растворителями НД4 и НД14.10, полученные с применением ВКЭ, показали четкое разделение между извлечениями на соответствующем графике оценок. Анализ при сравнении выявил 85,7% и 5,9% от общей дисперсии, объясняемых главными компонентами 1 (PC1) и 2 (PC2) соответственно (рис. 7 а). Иерархический кластерный анализ показал четкое разделение между двумя группами извлечений (рис. 7 б). Согласно данным volcano plot, полученного по результатам t-теста, 105 и 38 метаболитов, демонстрирующих кратные изменения уровня содержания $FC \geq 2$, были более эффективно извлечены с помощью НД4 и НД14.10 соответственно (рис. 7 в).

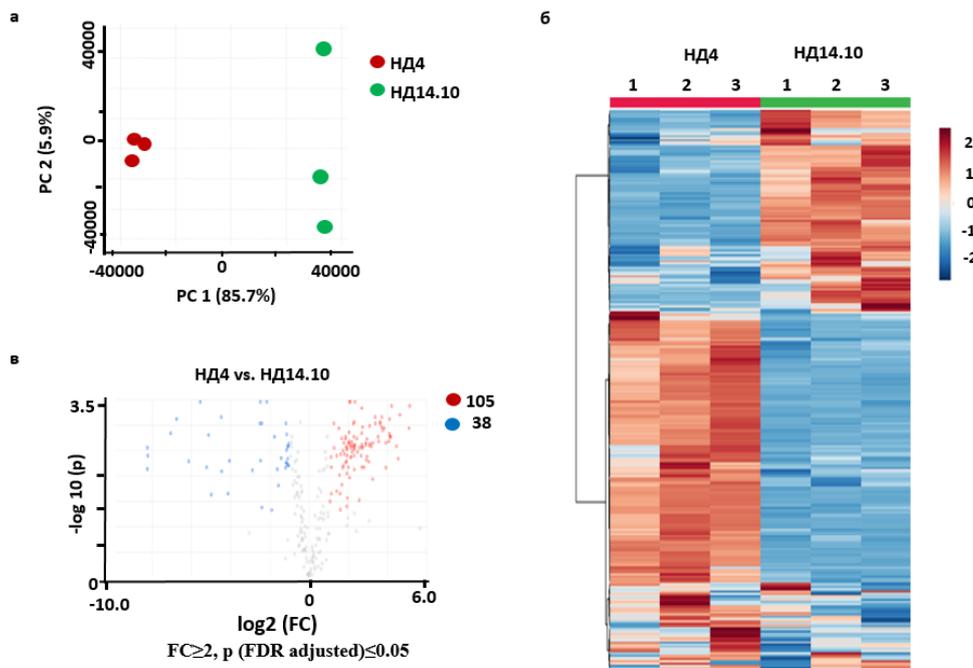


Рисунок 7 – Сравнение профилей вторичных метаболитов корней аралии маньчжурской, извлеченных методом ВКЭ, с НД4 и НД14.10: результаты анализа главных компонент (PCA) с графиком оценок (а), тепловая карта (б) и volcano plot (в)

Сравнение эффективности методов экстракции

Учитывая, что растворитель НД4 извлекал наибольшее количество метаболитов, на третьем этапе мы проводили попарное сравнение эффективности ВКЭ с мацерацией и УЗЭ для извлечений, полученных с данным экстрагентом.

При сравнении ВКЭ с мацерацией и УЗЭ НСА показал четкое разделение между группами метаболитов (рис. 8 а,б). Сравнение спектра метаболитов по t-критерию выявило увеличение содержания 3 и 46 метаболитов, демонстрирующих кратные изменения уровня содержания $FC \geq 10$, которые извлечены путем мацерации и ВКЭ соответственно. Сравнение двух групп с использованием t-критерия показало увеличение содержания 108 и 1 метаболита, демонстрирующие кратные изменения уровня содержания $FC \geq 10$, которые извлечены путем ВКЭ и УЗЭ соответственно. Этот факт указывает на преимущество метода виброкавитационной экстракции перед мацерацией и ультразвуковой обработкой.

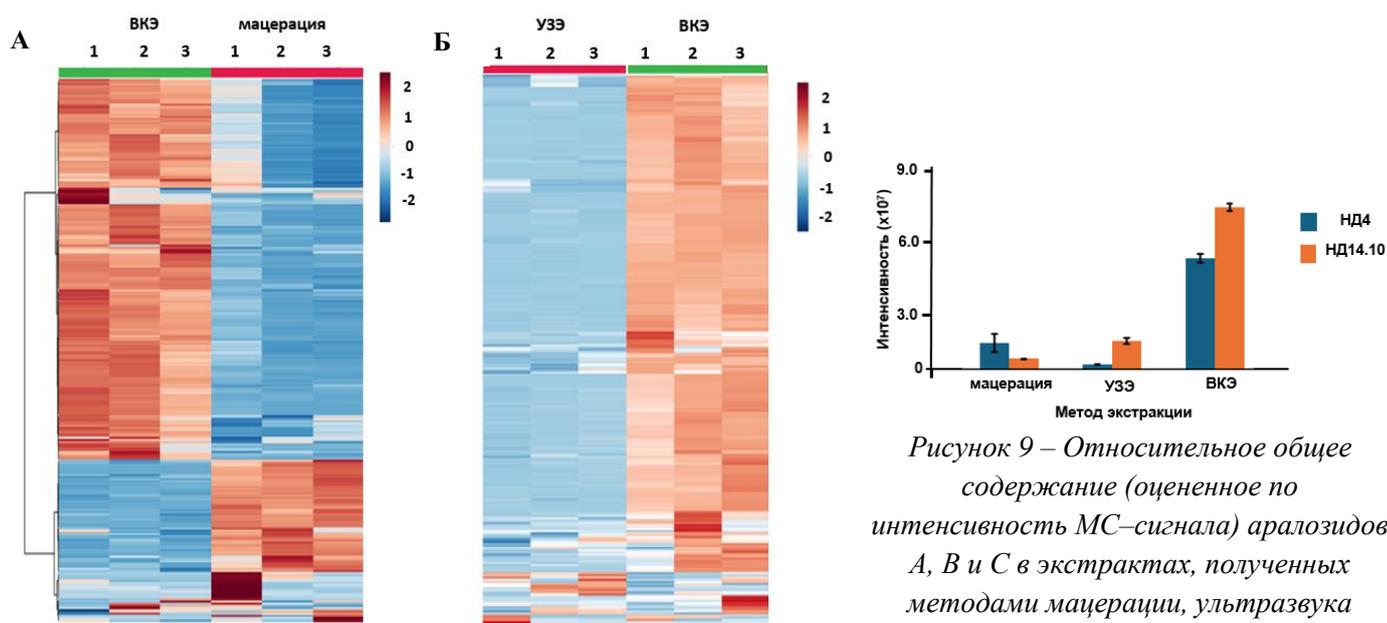


Рисунок 8 – Сравнение профилей вторичных метаболитов корней аралии маньчжурской, экстрагированных с растворителем HD4: тепловая карта анализа извлечений при мацерации и ВКЭ (а), тепловая карта анализа извлечений при УЗЭ и ВКЭ (б)

Рисунок 9 – Относительное общее содержание (оцененное по интенсивность MS-сигнала) аралозидов А, В и С в экстрактах, полученных методами мацерации, ультразвука (УЗЭ) и виброкавитационной экстракции (ВКЭ)

Поскольку аралозиды А, В и С являются маркерными соединениями среди биологически активных компонентов аралии, рекомендованными Фармакопеями России и Белоруссии для контроля качества лекарственных форм, были получены хроматограммы селективных ионов (ХИС, $m/z \pm 0,02$) с m/z 925,4796, 1057,5255 и 1087,5308, соответствующих ионам [М-Н]- аралозидов А, В и С. Так как эти три метаболита характеризуются высоким сходством структуры, можно ожидать, что они будут иметь весьма схожую эффективность ионизации. Поэтому сравнивались суммы интенсивностей их сигналов в извлечениях, полученных методами мацерации, УЗЭ и ВКЭ с использованием двух NADES. Значения общей интенсивности существенно различались при применении разных методов экстракции, тогда как различия, обусловленные природой NADES, были менее выраженными, хотя и значимыми (рис. 9). В этом эксперименте было подтверждено, что ВКЭ является эффективным методом извлечения трех маркерных аралозидов, тогда как мацерация и УЗЭ в целом были сопоставимы.

Процедура ВКЭ (рис. 4) сочетает в себе ультразвуковое воздействие и механическое измельчение растительного сырья с последующей интенсивной циркуляцией полученной мелкодисперсной суспензии с растворителем. Локально повышается температура в узком зазоре между рабочими частями виброкавитатора. Это приводит к снижению вязкости NADES, что сопровождается улучшением растворимости экстрагируемых метаболитов. Благодаря частичному механическому разрушению растительных клеток метаболиты растворяются в NADES, что еще больше увеличивает выход экстракции. В ходе циркуляции в стакане полученная мелкодисперсная суспензия растительного материала в NADES с высокой скоростью сжимается, при этом в зонах сжатия повышается давление. Избыточное давление на выходе рабочих органов виброкавитатора накладывается на давление гидроциркуляции в экстракторе и достигает нескольких атмосфер. На этапе разрежения во всем объеме дисперсии образуются полости и кавитационные пузырьки, особенно на границах твердой и жидкой фаз, т. е. в местах контакта жидкости с мелкими твердыми растительными частицами. При

повторном сжатии эти пузырьки схлопываются, развивая давление до сотен атмосфер, в результате чего образуется очень интенсивная ударная волна. Это приводит к дополнительному механическому разрушению твердых частиц растительной матрицы и выделению небольших объемов жидкости с границы раздела фаз, распадающейся на мелкие капли. Эти явления помогают понять высокую эффективность экстракции NADES с помощью виброкавитатора.

Наши расчеты показали, что энергозатраты при применении виброкавитационной экстракции снижаются в 3-4 раза по сравнению с УЗЭ и мацерацией. Сочетание NADES и виброкавитационной экстракции является перспективной «зеленой» ресурсосберегающей технологией для извлечения биологически активных веществ из корней аралии маньчжурской. Очевидно, что разработанный нами метод извлечения биологически активных веществ может быть применен для других видов лекарственного растительного сырья.

В ходе наших экспериментов мы идентифицировали 47 индивидуальных соединений из корней аралии. Согласно данным литературы, с этими соединениями могут быть связаны ряд фармакологических активностей: кардиопротекторное, гепатопротекторное, антигликирующее, гиполипидемическое, противовоспалительное, нейропротекторное, противоопухолевое, антидиабетическое и др.

Учитывая способность NADES к «настройке», открываются возможности по созданию новых лекарственных препаратов с селективной заданной фармакологической активностью. Исследования по безопасности и эффективности NADES извлечений и лекарственных форм на их основе позволят привести к практическому применению технологий «зеленой» экстракции в фармацевтической промышленности, в соответствии с Указом Президента РФ В.В. Путина от 18.06.2024 г. №529 «Об утверждении приоритетных направлений научно-технологического развития и перечня важнейших наукоемких технологий», в части, превентивной и персонализированной медицине, обеспечения здорового долголетия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приготовлена серия NADES, в которых в качестве доноров водородных связей использованы органические кислоты, а в качестве акцепторов – холин хлорид и сорбит. Наиболее экономическим выгодным и быстрым является метод приготовления с использованием микроволнового излучения.

Впервые проведено изучение пригодности семи природных глубоких эвтектических растворителей и подобраны составы для эффективной экстракции тритерпеновых сапонинов на основании результатов целевого профилирования метаболитов. В NADES извлечениях методом УВЭЖХ-МС было идентифицировано двадцать тритерпеновых сапонинов (производных олеаноловой кислоты). Некоторые из них были идентифицированы в корнях впервые.

NADES оказались более эффективными растворителями, чем вода и этанол для экстракции одиннадцати тритерпеновых сапонинов. Результаты данного эксперимента доказывают перспективу замены воды и спирта новым классом нетоксичных «зеленых» природных глубоких эвтектических растворителей для экстракции тритерпеновых сапонинов из корней аралии маньчжурской.

Разработаны подходы к оценке качественного и количественного состава с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором. Сумму сапонинов корней аралии впервые предложено определять по сумме площадей пиков соединений в пересчете на аралозид А.

Согласно результатам дисперсионного анализа многофакторного эксперимента по изучению влияния типа NADES, метода (мацерации и УЗЭ), времени и температуры экстракции на выход ТС, наибольшее влияние оказывал метод экстракции (30,8%) и температура экстракции (33,3%). Тип NADES также влиял на функцию отклика ($p=0,0033<0,05$), но его вклад был 1,1%. При варьировании указанных факторов содержание ТС в NADES извлечениях увеличивалось с 41,5 мг/г при мацерации (нагрев до 60 °С) до 85,9 мг/г при низкотемпературной (45 °С) УЗЭ. Повышение температуры УЗЭ вело к снижению выхода ТС.

Впервые эффективность мацерации, ультразвуковой и виброкавитационной экстракции сравнили на уровне метаболомных профилей NADES извлечений. По результатам анализа главных компонент и анализа иерархической кластеризации установлено, что NADES состоящий из холина хлорида/яблочной кислоты (1:1), является наиболее предпочтительным экстрагентом, а виброкавитационный метод показал самую высокую эффективность экстракции по сравнению с мацерацией и ультразвуковой обработкой. Особенностью ВКЭ является сочетание ультразвукового воздействия и механического измельчения растительного сырья с последующей интенсивной циркуляцией полученной мелкодисперсной суспензии с растворителем. В зазоре между статором и ротором наблюдается локальное кратковременное повышение температуры, что приводит к снижению вязкости NADES и сопровождается улучшением растворимости экстрагируемых метаболитов. За счет механического измельчения сырья часть действующих веществ вымывается из клеток, что увеличивает выход. Наши результаты указывают на высокую эффективность виброкавитационной экстракции для извлечения метаболитов аралии из грубого растительного сырья.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации, рекомендованные ВАК Минобрнауки России

1. **Калета, А. А.** Дисперсионный анализ в интерпретации процесса экстракции тритерпеновых сапонинов из *Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J. Wen с использованием природных глубоких эвтектических растворителей / **А. А. Калета**, О. Н. Пожарицкая, Е. В. Флисюк, А. Н. Шиков // Известия ГГТУ. Медицина, фармация. – 2024. – № 3(19). – С. 115-122.

Статьи в журналах, включенных в международные базы Scopus и Web of Science

2. **Kaleta, A.** The Effects of Selected Extraction Methods and Natural Deep Eutectic Solvents on the Recovery of Active Principles from *Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J. Wen: A Non-Targeted Metabolomics Approach / **A. Kaleta**, N. Frolova, A. Orlova, A. Soboleva, N. Osmolovskaya, E. Flisyuk, O. Pozharitskaya, A. Frolov, A. Shikov // Pharmaceuticals. – 2024. – Vol. 17. – № 3. – P. 355. – DOI 10.3390/ph17030355.
3. **Petrochenko, A.** Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Triterpene Saponins from *Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J. Wen / **A. Petrochenko**, A. Orlova, N. Frolova E. Serebryakov, A. Soboleva, E. Flisyuk, A. Frolov, A. Shikov // Molecules. – 2023. – Vol. 28. – № 8. – P. 3614. – DOI 10.3390/molecules28083614.

Другие публикации

4. **Петроченко, А. А.** ТСХ-«фингерпринт» и анализ экстрактов аралии маньчжурской (*Aralia elata* var. *mandshurica* Rupr. Et Maxim.) J. Wen с применением природных глубоких эвтектических растворителей / **А. А. Петроченко** // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего», Санкт-Петербург, 14 – 18 марта 2022 года. – [электронное издание]. – Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ, 2022. – С. 803-806.
5. **Petrochenko, A.A.** The ability of Natural Deep Eutectic Solvents to extract triterpenoid saponins of *Aralia mandshurica* / **A. A. Petrochenko**, A.N. Shikov // Conference Handbook of « The 5th Belt and Road» International Conference on Traditional Medicine & Symposium on Traditional Chinese Medicine, China, 16-17 December, 2022.
6. **Петроченко, А. А.** Экстракция тритерпеновых сапонинов с помощью природных глубоких эвтектических растворителей из аралии маньчжурской (*Aralia mandshurica*) / **А. А. Петроченко** // Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции школьников, студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 1 марта – 11 апреля 2023 года. – [электронное издание]. – Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ, 2023.– С. 1138-1143.
7. **Petrochenko, A. A.** The natural deep eutectic solvents for extraction of different parts of the root of *Aralia mandshurica* / **A. A. Petrochenko**, A. N. Shikov // Сборник материалов XXIV Международного Съезда «Phytofarm 2023», Санкт-Петербург, 25–27 мая 2023 года. – Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ, 2023. – P. 76-77.
8. **Petrochenko, A.A.** The way of intensification of extraction triterpenoid saponins from *Aralia mandshurica* with natural deep eutectic solvents / **A. A. Petrochenko** // Conference Handbook of « The 6th Belt and Road» International Conference on Traditional Medicine & Symposium on Traditional Chinese Medicine, China, 7-9 December, 2023.
9. **Калета, А. А.** Сравнение эффективности различных методов экстракции аралозидов с использованием природных глубоких эвтектических растворителей / **А. А. Калета** // Сборник материалов XIV Всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 28 марта – 02 апреля 2024 года. [электронное издание]. – Санкт-Петербург : Изд-во СПХФУ, 2024.– С. 852-856.