

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ХИМИКО-
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



КАЛЕТА АЛЁНА АЛЕКСЕЕВНА

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

3.4.1 Промышленная фармация и технология получения лекарств

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, доцент,
Шиков Александр Николаевич

Санкт-Петербург
2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. <i>Аралия маньчжурская</i>	12
1.2. <i>Экстрагирование биологически активных веществ из растительного сырья</i>	17
1.3. <i>Современные методы экстракции биологически активных веществ из растительного сырья</i>	20
1.4. <i>Природные глубокие эвтектические растворители</i>	27
ВЫВОДЫ ГЛАВЫ 1	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
2.1. <i>Растительный объект</i>	47
2.2. <i>Реактивы (реагенты)</i>	49
2.3. <i>Оборудование</i>	51
2.4. <i>Методы физико-химического анализа</i>	53
2.5. <i>Статистическая обработка</i>	56
ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ЭНЕРГОЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРИРОДНЫХ ГЛУБОКИХ ЭВТЕКТИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ	57
3.1. <i>Приготовление NADES</i>	57
3.2. <i>Расчеты энергопотребления процесса приготовления растворителей с помощью различных методов</i>	62
ВЫВОДЫ ГЛАВЫ 3	63
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ПРИГОДНОСТИ ПРИРОДНЫХ ГЛУБОКИХ ЭВТЕКТИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ САПОНИНОВ	64
4.1. <i>Планирование эксперимента</i>	64
4.2. <i>Тритерпеновые сапонины, идентифицированные в извлечениях</i>	66
4.3. <i>Результаты сравнения извлекающей способности природных глубоких эвтектических растворителей, воды и этилового спирта</i>	73
ВЫВОДЫ ГЛАВЫ 4	79
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОСТАВА РАСТВОРИТЕЛЕЙ, МЕТОДА И УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ВЫХОД ТРИТЕРПЕНОВЫХ САПОНИНОВ	80

<i>5.1. Валидация методики качественного и количественного анализа тритерпеновых сапонинов</i>	82
<i>5.2. Планирование эксперимента по интенсификации экстракции тритерпеновых сапонинов из корней Аралии маньчжурской</i>	88
<i>5.3. Результаты дисперсионного анализа для интерпретации процесса экстракции тритерпеновых сапонинов.....</i>	89
ВЫВОДЫ ГЛАВЫ 5.....	98
ГЛАВА 6. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ АРАЛИИ.....	99
<i>6.1. Планирование эксперимента</i>	99
<i>6.2. Результаты сравнения методов интенсификации процесса экстракции биологически активных веществ из Аралии.....</i>	102
<i>6.3. Фармакологические эффекты, описанные для идентифицированных соединений</i>	123
ВЫВОДЫ ГЛАВЫ 6.....	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	127
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	130
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	152
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	198
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	200

ВВЕДЕНИЕ

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 [1], 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) [2-5]. NADES применяли для извлечения БАВ из некоторых растений-адаптогенов, в частности, корней женьшеня ложного (L. Duan, et al., 2016) [6], корневищ и корней элеутерококка колючего (X. Shi, et al., 2020) [7].

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 [8]. Н.С. Цветов с соавторами (2019) использовали эвтектические растворители для экстракции корневищ и корней родиолы розовой [9,10]. Изучением применения NADES для извлечения БАВ из

различного сырья занимаются А.Н. Шиков с соавторами (2020, 2021, 2023) [11-13], Е.Г. Ковалева с соавторами (2020) [14], М.А. Джавахян с соавторами (2022) [15]. 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 применением 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Аралия маньчжурская

1.1.1. Ботаническая характеристика

Аралия маньчжурская (*Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J. Wen) [16] является представителем рода *Aralia*, который насчитывает 88 видов по данным всемирного списка растений и относится в семейству *Araliaceae* (рис. 1).



Рисунок 1 – Гербарий растения *Aralia mandshurica* (Rupr. & Maxim.) (образец MW0107414)

Это кустарник или дерево до 3-7 м, а иногда и 12 м высотой с серым стволом или стволиками, усаженными крепкими треугольными и острыми шипами. Листья крупные, дважды непарноперистосложные и с длинными буровато-красными черешками, опушенными ржавыми волосками. Обычно они сосредоточены у вершины ствола в форме огромной раскидистой розетки. Листочки сложного листа яйцевидные или реже эллиптические, до 13 см длиной, сидячие или с короткими черешками, сверху ярко-зеленые и голые, а снизу более светлые и опушенные, особенно по жилкам. Желтовато-белые мелкие обополюе и однополюе цветки собраны в зонтики, которые в свою очередь образуют общее сильно разветвленное метельчатое соцветие до 60 см длиной. Сине-черные сочные шаровидные плоды мелкие и содержат 5 косточек. В сухом состоянии они с пятью сильно выступающими ребрами. Растение цветет в конце лета, а его плоды созревают в сентябре-октябре [17]. На рис. 1 представлен гербарий данного растения [18].

Лекарственным растительным сырьём являются корни данного растения. Действие лекарственных растительных препаратов определяется химическим составом сырья.

1.1.2. Химический состав

По данным обзорной статьи, опубликованной Y. Xu и соавторами (2023), в составе растений рода аралии идентифицировано около 300 соединений. Двумя преобладающими группами биологически активных компонентов являются тритерпеновые сапонины (ТС) и терпеноиды. Помимо этого, в составе обнаружены фенилпропаноиды, полиацетилены, флавоноиды, органические кислоты и их производные, и другие [19]. В таблице 1 Приложения 1 приведены структурные формулы, молярные массы и отношение массы к заряду (m/z) основных тритерпеновых сапонинов, выделенных из сырья аралии маньчжурской.

Изучение распределения сапонинов в клетках корней аралии не проводилось, судя по отсутствию литературных данных, однако существуют

гистохимические исследования схожих растительных клеток. Например, гистохимический анализ растения *Соломоцвета двузубого* показал, что тритерпеновые сапонины обнаруживаются в перицикле, первичной флоэме, паренхиме клеток между первичной флоэмой и первичной ксилемой (в первичном корне), во вторичной флоэме и паренхиме клеток феллодермы (во вторичном корне). По мере развития камбия, сапонины также обнаруживали в дополнительных клетках камбия, а также во флоэме сосудистых пучков. Сапонины, в основном, были обнаружены в клетках флоэмы нормальных сосудистых пучков и медуллярных сосудистых пучков стеблей [20]. Это свидетельствует о накоплении сапонинов внутри клеток корня.

Фармакологическую активность аралии маньчжурской связывают с аралозидами А, В, С (рис. 2).

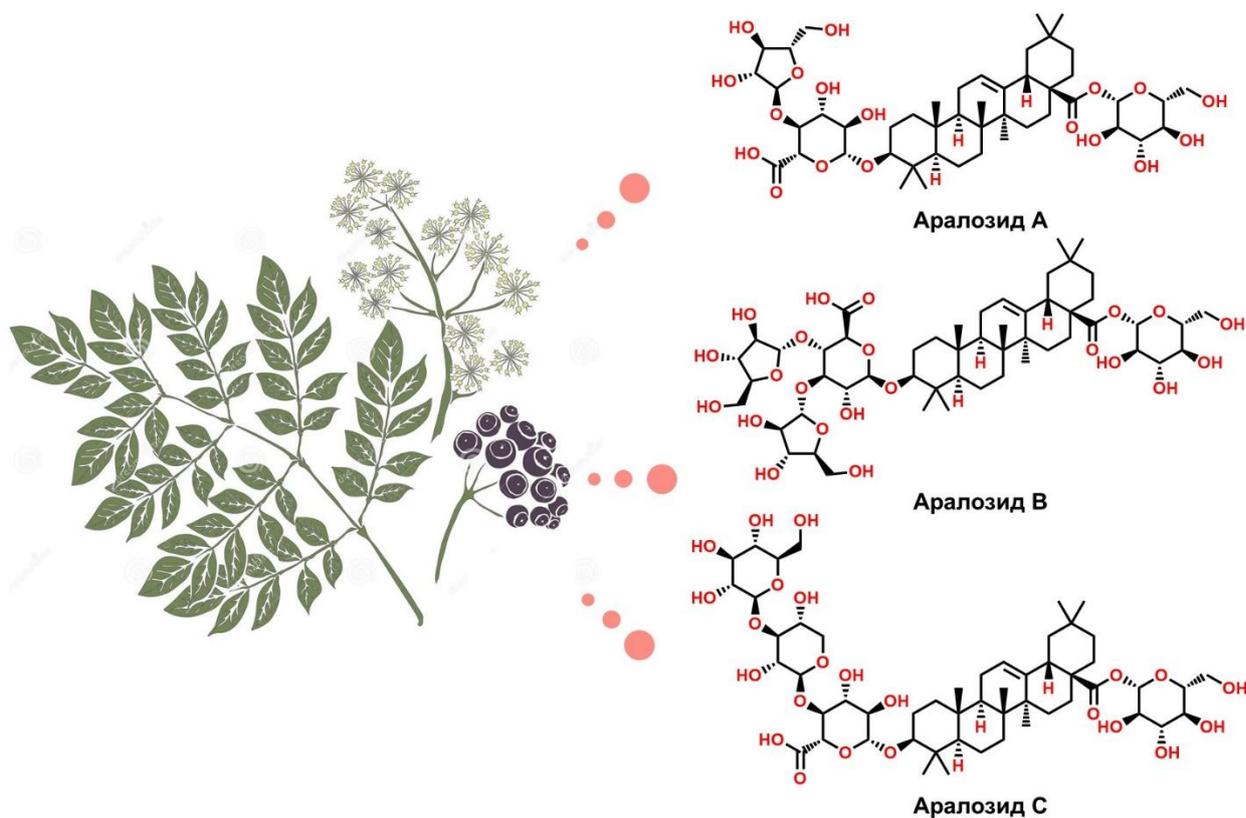


Рисунок 2 – Структуры аралозидов А, В, С

Эти соединения являются маркерами для стандартизации ЛРС и ЛРП, в соответствии со статьями Государственной фармакопеи Российской Федерации, Белорусской фармакопеи, а также Японской фармакопеи [21].

1.1.3. Фармакологическая активность

Фармакологические исследования извлечений данного растения начались в 1951 году в лаборатории фармакологии Всесоюзного (ныне Всероссийского) научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР). Было доказано, что настойка корней аралии обладает возбуждающими свойствами [22].

Активное изучение эффектов при применении дибазола, экстрактов женьшеня, элеутерококка и др. связано с исследованиями повышения устойчивости организма при действии неблагоприятных факторов [23]. В 1958 году академиком Н.В. Лазаревым была сформулирована концепция об особом состоянии организма, которое характеризуется неспецифически повышенной резистентностью к стрессу. Для достижения такого состояния необходимо «приучать» организм к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды, либо вводить в организм некоторые лекарственные препараты [24]. Таким лекарственным препаратам Н.В. Лазаревым было дано название «адаптогены» [23]. В 1968 году были сформулированы требования к адаптогенам. Во-первых, адаптоген должен быть совершенно безвредным для организма, обладать большой широтой терапевтического действия, вызывать минимальные сдвиги в нормальных функциях организма или вовсе не вызывать и проявлять свое адаптогенное действие только на соответствующем фоне. Во-вторых, действие адаптогена должно быть неспецифично в том смысле, что должна повышаться сопротивляемость к вредному влиянию весьма широкого набора факторов физической, химической и биологической природы. В-третьих, действие адаптогена должно быть тем более выражено, чем более глубоки неблагоприятные сдвиги в организме. В-четвертых, адаптоген должен обладать нормализующим действием независимо от направленности предшествующих сдвигов [25]. С развитием данной концепции современное определение звучит следующим образом: «адаптогены – природные соединения или растительные экстракты,

способствующие адаптации, устойчивости и выживанию организма в условиях стресса» [26].

К адаптогенам относят ряд препаратов растительного происхождения (настойки плодов лимонника китайского, корня женьшеня обыкновенного, заманихи высокой, корней аралии маньчжурской, экстракт левзеи сафлоровидной, родиолы розовой, элеутерококка колючего), животного происхождения (экстракт из пантов марала – пантокрин, из рогов сайгака – сайтарин, рогов северного оленя - рантарин) и т.п. [27].

Фармакологическую активность аралии связывают с различными соединениями (таблица 2 Приложение 1). Извлечения из лекарственного растительного сырья чаще представляют собой сумму БАВ, которые оказывают широкий спектр фармакологических эффектов.

1.1.4. Лекарственные препараты на основе Аралии маньчжурской

По состоянию на 2024 год в Российской Федерации зарегистрировано два препарата, содержащих корни аралии маньчжурской – настойка и растительный сбор «Арфазетин» (<https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx>, дата доступа 09.10.2024 г.).

Настойка аралии стимулирует центральную нервную систему, оказывает тонизирующее, гипертензивное и гипогликемическое действие. Применение настойки показано при артериальной гипотонии, астеническом синдроме, физическом и психическом переутомлении. Стоит отметить, что данная настойка производится с использованием 70% этилового спирта. Данный растворитель имеет существенные недостатки: фармакологическая неиндифферентность, пожаро-, взрывоопасность, необходимость ведения строгого учета.

Сбор «Арфазетин» включает в себя также корневища с корнями *Элеутерококка колючего*, цветки *Ромашки аптечной*, траву *Зверобоя продырявленного*. Данный препарат обладает гипогликемическим действием и применяется при сахарном диабете 2 типа.

В 1969 году впервые был описан лекарственный препарат «Сапарал», представляющий собой таблетки, содержащие сумму тритерпеновых сапонинов, для лечения астеноневротических расстройств, связанных с переутомлением, а также при пониженном кровяном давлении [28]. В настоящее время данный ЛП не выпускается.

1.2. Экстрагирование биологически активных веществ из растительного сырья

Промышленный процесс получения целевых соединений из растительного сырья включает в себя проведение последовательных этапов, которые должны осуществляться соответствующим образом. Одним из важнейших этапов является экстракция. В результате получают извлечение, которое должно быть очищено от балластных и сопутствующих веществ. Экстракция – это стадия массопереноса одного или нескольких компонентов из одной фазы в другую. Целями экстракции для решения задач промышленного производства являются высокий выход БАВ, высокая селективность/чистота. Необходимо при этом учитывать, что целевые компоненты должны быть в нативной форме.

При извлечении имеет место ряд физико-химических процессов, протекающих внутри клетки и на ее поверхности, таких как набухание, вымывание, десорбция, диффузия, диализ и осмос [29]. После контакта растворителя с растительной матрицей происходит пропитывание и набухание растительного сырья. За счет процесса молекулярной диффузии экстрагент проникает в твердую матрицу через пористую стенку, заполняет внутреннее пространство клетки и вытесняет воздух (рис. 3а). В клетке при взаимодействии растворителя с компонентами клеточных мембран и клеточного содержимого образуется концентрированный раствор БАВ (первичный сок) путем десорбции [30, 31]. При десорбции и растворении целевых веществ происходит разрыв химических связей (рис. 3б) [29].

Впоследствии происходит переход растворенных веществ в экстрагент посредством массообмена. Переход веществ возможен только из фазы с большей концентрацией в фазу с меньшей концентрацией, при наличии разности, что является основной движущей силой процесса. Вещества накапливаются в пограничном слое растворителя, который может играть ограничивающую роль, однако, чем меньше данный слой, тем быстрее возрастает количество целевых компонентов, вследствие большей разности концентраций (рис. 3в). Таким образом, происходит диффузия в движущемся слое растворителя не только за счет молекулярного движения, но и механического, что обозначается как конвективная диффузия [31].

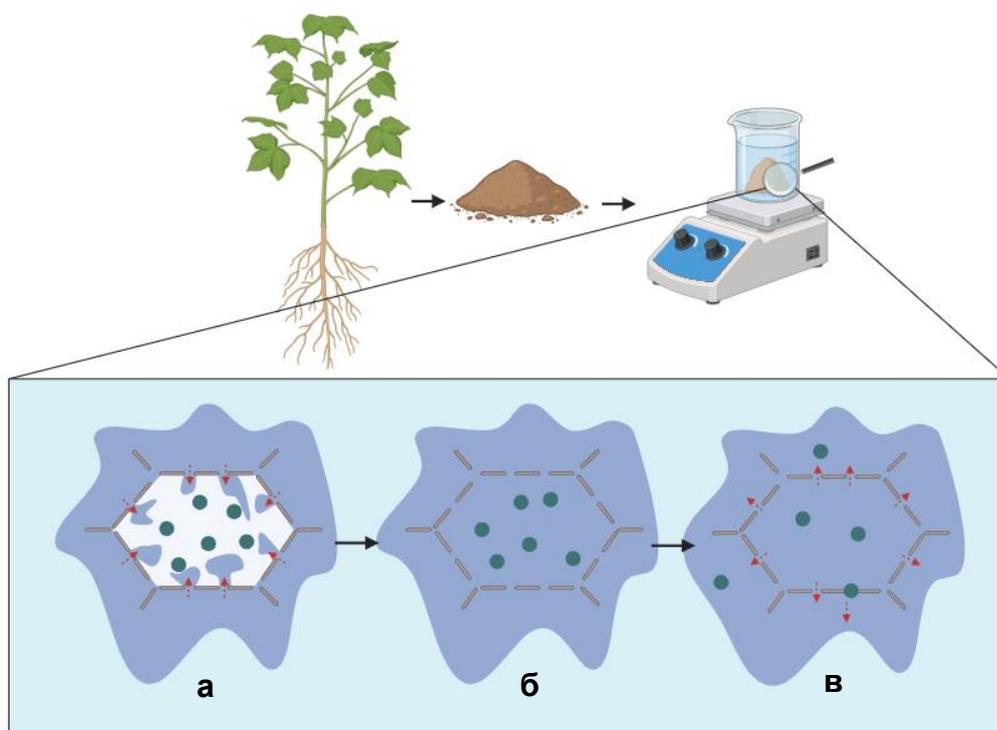


Рисунок 3 – Механизм экстракции БАВ из растительного сырья (создано с помощью <https://app.biorender.com/>)

Извлечение целевых соединений из твердой матрицы является сложным многостадийным процессом и на результат влияет множество факторов. Эти факторы важно оценивать при разработке, чтобы интенсифицировать процесс экстракции.

Растительная матрица представляет собой твердый пористый материал, растворителем для извлечения целевых веществ чаще всего является жидкость. Информация о химических свойствах и совместимости растворителя и растворяемых веществ, необходима для прогнозирования растворимости и смешиваемости [29]. Совместимость основана на оценке полярности растворителя и растворенного вещества. Считается, что преимущественно неполярные соединения растворяются в неполярном растворителе, тогда как полярные соединения – в полярном растворителе. В результате этого при растворении образуется гомогенный раствор.

При разработке методики экстракции должна учитываться локализация действующих веществ в растительном сырье, анатомическая особенность тканей [29]. Целевые соединения могут быть адсорбированы на поверхности матрицы, растворены в матрице и/или адсорбированы на пористой поверхности, растворены/адсорбированы в микро/нанопорах, химически связаны с матрицей или растворены в среде [32]. В зависимости от этого растворитель легче получает доступ или наоборот сложнее к целевым веществам. В сырье с грубой морфологической структурой (семена, плоды, корни, кора, корневища) соединения обычно равномерно распределены в твердом теле, тогда как в листьях, цветках вещества находятся внутри трихом [33]. В связи с прочной структурой грубого сырья затруднено проникновение растворителя в клетки. Для извлечения биологически активных веществ из грубого сырья необходимо значительное время для проникновения и растворения компонентов [34].

Таким образом, на процесс экстракции оказывают влияние различные факторы, которые приведены в таблице 1.

Таблица 1. Факторы, влияющие на протекание процесса экстракции

Фактор	Влияние на процесс экстракции [29]
Гистологическое строение растительного сырья	Плотная клеточная оболочка, недостаточно рыхлая клеточная ткань, малое количество межклеточных ходов и каналов может затруднять извлечение

Степень измельченности сырья (размер частиц)	Измельчение приводит к увеличению поверхности соприкосновения растворителя и сырья, однако чрезмерно высокая степень измельчения приводит к слеживанию порошка, повышению числа клеток с разрушенной оболочкой, комкованию из-за высокого содержания пектиновых веществ, слизи и крахмала (они облегчают растворение и набухают)
Вязкость экстрагента	Менее вязкие жидкости способствуют более быстрой экстракции. При повышении температуры увеличивается коэффициент диффузии за счет уменьшения вязкости растворителя
Свойства БАВ	Определяется растворимостью веществ в экстрагенте, чем выше растворимость, тем выше способность извлекать соединения
Продолжительность	При длительной экстракции коэффициент диффузии сначала быстро возрастает, а затем приближается к максимальному значению. По истечении некоторого времени концентрации по обе стороны клеточной оболочки выравниваются. Стоит отметить, что при более продолжительной экстракции в извлечении могут переходить балластные вещества
Температура	Повышение температуры ведет к усилению диффузии и осмоса, повышению растворимости экстрагируемых веществ, свертыванию белков, разрушению ферментов. Многие клетки при высокой температуре разрываются, что увеличивает вымывание. С другой стороны, при слишком высокой температуре БАВ могут разлагаться, теряя терапевтическую ценность, летучие вещества могут улетучиваться, может изменяться растворимость веществ, в извлечение из разрушенных клеток могут переходить балластные вещества
Разность концентраций	С увеличением разности концентраций возрастает количество диффундирующего вещества, практически может осуществляться за счет перемешивания, замены чистым растворителем или менее концентрированным извлечением

1.3. Современные методы экстракции биологически активных веществ из растительного сырья

Основной принцип, который используется для получения растительных субстанций – это твердо-жидкофазная экстракция. Среди методов экстракции выделяют «классические», к которым относятся мацерация, ремацерация, анфлераж, дистилляция паром, настой, отвар, перколяция, репеколяция и т.п. Такие методы имеют недостатки применения для экстракции [35]. Помимо «классических» существуют современные методы, которые позволяют интенсифицировать извлечение целевых компонентов. Среди современных методов следует выделить сверхкритическую флюидную экстракцию,

экстракцию жидкости под давлением, экстракцию в импульсном электрическом поле, ультразвуковую экстракцию (УЗЭ), микроволновую экстракцию, виброкавитационную экстракцию (ВКЭ) и экстракцию в роторно-пульсационном аппарате (РПА) и др.

Сверхкритическая флюидная экстракция

Данный метод основан на использовании в качестве экстрагента сверхкритических флюидов или жидкостей. Сверхкритическая жидкость (плотный газ) представляет собой вещество, обладающее физическими свойствами газа и жидкости при заданной критической температуре и давлении, что приводит к резкому изменению его растворяющих свойств.

Образование растворителя происходит при нагревании газа выше его критической температуры или при сжатии жидкости выше критического давления. Преимуществами сверхкритических жидкостей является сочетание свойств газа, таких как высокая скорость диффузии, низкая вязкость, сжимаемость, и свойств жидкостей – высокая плотность и высокая растворяющая способность [36]. При использовании сверхкритических флюидов в качестве экстрагента не происходит разрушения целевых компонентов, упрощается процесс их разделения. Метод является экологически чистым, энерго- и ресурсосберегающим, отличается возможностью создания замкнутого цикла с получением продукта с высокой степенью чистоты без снижения биологической активности [37]. Метод позволяет регулировать растворяющую способность, используя давление и, реже, температуру для изменения плотности жидкости. Ненужные компоненты можно отделять, а целевые продукты избирательно экстрагировать и концентрировать. Немаловажным преимуществом является отсутствие остаточных растворителей в конечном продукте [38]. Однако при исполнении данного процесса он может продолжаться длительное время. Оборудование является дорогостоящим и требует высококвалифицированного обслуживания. Углекислый газ (CO_2), который

чаще всего используется в качестве экстрагента, имеет низкую способность извлекать полярные соединения [35].

Экстракция под давлением

В качестве замены классическим методам используется жидкостная экстракция под давлением. При высоком давлении в экстракторе температура экстракции может быть выше температуры кипения растворителя. Состояние растворителя не изменяется, однако за счет увеличения давления и температуры происходит повышение и скорость диффузии экстрагента в пористую структуру клеток [39,40]. Экстракция под давлением позволяет не только сократить количество экстрагента, но ускорить процесс извлечения. При этом сокращается время агрессивного воздействия высокого давления и температуры. Ограничениями применения метода является сложность и высокая стоимость аппаратного оформления [35].

Экстракция в импульсном электрическом поле

Данный метод заключается в том, что сырье помещается между электродами и электрическим полем высокого напряжения. Согласно одной из гипотез о механизме данного метода при действии электрического поля (> 1 В) нарушается дипольная природа молекул клеточной мембраны, при отталкивании между заряженными молекулами изменяется ее эластичность и образуются поры, такое явление называется «электропроницаемость» или «электропорация». Вследствие этого повышается проницаемость растворителя в клетку и компоненты вымываются из клетки в растворитель, что увеличивает массоперенос. Отличительной особенностью является незначительное изменение температуры, следовательно, такой метод может быть использован для термолабильных веществ [41,42]. Согласно другой гипотезе, воздействие электрического поля вызывает ускорение химических реакций за счет импульса, вызывающего резонансные колебания [43].

В процессе используется электрическое поле от умеренного до сильного, что позволяет потреблять меньше энергии, меньший объем растворителя и происходит уменьшение времени экстракции [44].

Стоит отметить, что широкие пределы варьирования условий экстракции (напряженность электрического поля и частота) затрудняют оптимизацию данного процесса. Для осуществления метода требуется длительная пробоподготовка лекарственного растительного сырья [35].

Ультразвуковая экстракция

Одним из методов, который позволяет интенсифицировать процесс экстракции, является ультразвук. Данный метод основан на воздействии ультразвуковой волны на среду. В процессе экстракции имеет место явление кавитации. В обычных условиях молекулы жидкой среды удерживаются вместе из-за сил притяжения, однако по мере прохождения ультразвуковой волны она может вызывать продольное смещение этих молекул, действуя как поршень, при этом происходит смена фаз сжатия и разрежения. Молекулы временно смещаются из исходного положения и во время фазы сжатия сталкиваются с другими. А при фазе разрежения молекулы растягиваются за счет действия отрицательного давления. Из-за возможной высокой силы притяжения за счет действия ультразвука, в жидкости могут образовываться пустоты. Такие пустоты являются кавитационными пузырьками, которые образованы из растворенных газов. Эти пузырьки способны увеличиваться за счет поступления паров или газов во время фазы разрежения. При достижении критической точки в процессе сжатия, пузырьки могут разрушаться. Когда кавитационные пузырьки, находящиеся вблизи поверхности клетки, разрушаются, они разрушают и стенки растительной матрицы, и ее содержимое будет высвобождаться в среду, а с другой стороны, растворитель будет легче проникать внутрь клетки [40,45]. При этом увеличивается площадь соприкосновения растительных клеток с экстрагентом. Также в процессе обработки ультразвуком происходит механическое воздействие на

клеточные структуры за счет кавитации. Ультразвуковая обработка позволяет сократить время экстракции, количество растворителя и потребляемую энергию за счет эффективного массопереноса и энергии по сравнению с традиционными методами [46]. С другой стороны, селективность данного метода находится наравне с традиционными методами, что требует дальнейшей очистки для получаемых извлечений [35].

Микроволновая экстракция

Экстракция с использованием микроволнового излучения является быстрым способом получения целевых веществ из растительной матрицы. При таком методе уменьшается количество растворителя, отходы и выбросы в окружающую среду, негативное воздействие на человека. Микроволновая экстракция может осуществляться не только в лабораторных условиях, но и в промышленных масштабах, так как процесс изменяем под любой объем растворителя. Микроволны представляют собой электромагнитные волны, состоящие из двух полей: электрического и магнитного. Экстракция происходит за счет изменений в клеточной структуре, которые вызваны электромагнитными волнами. Прямое воздействие на материал способствует поглощению части энергии и преобразованию ее в тепло. За счет того, что при частотах микроволнового излучения происходит колебание молекул. Преобразование электромагнитной энергии в тепловую происходит в соответствии с двумя механизмами: ионной проводимости и вращению диполя, которые действуют одновременно. При воздействии излучения возникает электрофоретический поток ионов, после чего в растворе происходят столкновения молекул, а ионы меняют свое направление. При этом происходит трение, которое и обуславливает нагрев. Кроме того, поток ионов способствует миграции растворителя в растительную матрицу и тем самым облегчает растворение целевых соединений. Вращение диполя связано с попеременным движением полярных молекул, которые имеют дипольные моменты (постоянные или индуцированные электрическим полем), которые

пытаются выровняться с электрическим полем. По мере уменьшения поля тепловое беспорядок восстанавливается, что приводит к выделению тепловой энергии [47]. Однако для успешного проведения процесса микроволновой обработки необходимо подбирать подходящий растворитель. Следует учитывать свойство поглощения микроволнового излучения, растворимость соединений в растворителе, взаимодействие растворителя с сырьем, селективность растворителя. Чем выше дипольный момент растворителя, тем быстрее он будет нагреваться под влиянием микроволнового излучения. Данный метод настолько эффективен, что извлекается большое количество соединений, и это подразумевает необходимость последующего этапа очистки [48].

Виброкавитационная экстракция

В процессе виброкавитационной обработки происходит перемешивание сырья с растворителем и одновременно диспергирование и гомогенизация, размер частиц определяется зазором между статором и ротором. Смешанные компоненты подаются в смеситель для предварительной обработки. Далее смесь поступает в многоступенчатый гомогенизатор, состоящий из статора и ротора, где смесь одновременно диспергируется и гомогенизируется. Все этапы обработки выполняются в устройстве, собранном в единый блок с приводом [39].

С.С. Белокуровым с соавторами была доказана эффективность виброкавитационной экстракции по сравнению с ультразвуковой обработкой и сверхкритической флюидной экстракцией с использованием сырья - семян *Trigonella foenum-graecum* L. (*Пажитника сенного*). Эффективность экстракции 70% этанолом составила 2,03% при 60°C и частоте вращения ротора 5000 об/мин в течение 60 минут [49].

Экстракция в роторно-пульсационном аппарате

Этот метод сочетает в себе активный гидродинамический режим, поле механических колебаний в широком диапазоне частот, диспергирование, деформацию и резание. Роторно-импульсный экстрактор имеет небольшие габариты и простую конструкцию, состоящую по меньшей мере из двух коаксиально расположенных цилиндров с прорезями. Процессы в рабочей зоне этого устройства связаны с сочетанием различных гидродинамических явлений, включая высоко градиентный поток в зазоре между статором и ротором, интенсивную турбулизацию, насосный эффект, разнонаправленное поле скоростей, вихреобразование, кавитацию пульсации потока из-за изменений температуры, проходного течения и т.д. Экстракция в РПА отличается высокой эффективностью при минимальных требованиях к рабочему помещению и низком энергопотреблении. Благодаря особой конструкции и физическим свойствам аппарата для экстракции различного растительного сырья можно использовать как обычные жидкости, так и вязкие растворители, включая растительные масла [39]. Например, надземные части *Leonurus cardiaca* L. подвергались экстракции соевым маслом с применением РПА [50]. БАВ из цветков *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert были экстрагированы оливковым маслом. Содержание флавоноидов составило 15,0—1,2 мг/кг; кумаринов - 540,0-14,3 мг/кг [51,52]. Соединения из семян *Pinus sibirica* Du Tour были экстрагированы кукурузным маслом с использованием роторно-пульсационного аппарата при температуре около 40°C. Выход составил 85% [53].

Обобщая, необходимо отметить, что все вышеперечисленные методы имеют преимущества и ограничения, однако при выборе метода нужно руководствоваться не только этим. Следует учитывать свойства целевых компонентов, а также свойства растворителей, которые планируется использовать. Необходимо изучать конкретные методы при применении в процессе экстракции с теми или иными экстрагентами и для различных

биологически активных веществ, сравнивать эффективность той или иной технологии.

Помимо использования новых методов экстракции находит развитие использование альтернативных растворителей для извлечения биологически активных веществ. Одними из альтернативных растворителей являются природные глубокие эвтектические растворители.

1.4. Природные глубокие эвтектические растворители

1.4.1. Определение природных глубоких эвтектических растворителей

В XX веке начались исследования по изучению ионных жидкостей, которые представляют собой соединения, полностью состоящие из ионов, их температура плавления ниже 100 °С. Примером ионной жидкости является нитрат этиламмония, о котором впервые сообщил Paul Walden в 1914 году [54]. На сегодняшний день чаще всего используются ионные жидкости на основе имидазолия. Однако ионные жидкости являются токсичными, стойкими загрязнителями окружающей среды, для синтеза такого типа растворителей необходимо иметь специализированное оборудование, а также проведение стадий очистки [55].

В начале 2000-х годов был получен новый тип растворителей, которые получили название «глубокие эвтектические растворители» (Deep Eutectic Solvents, DES). По многим физико-химическим свойствам, глубокие эвтектические растворители являются близкими к ионным жидкостям [56]. В 2003 году А. Р. Abbott с соавторами описали значительное снижение температуры плавления смеси холина хлорида и мочевины. Это смеси двух компонентов, которые взаимодействуют посредством водородных связей с образованием эвтектического состава [57]. Глубокие эвтектические растворители представляют собой другой тип растворителя, потому что они образуются из ионных и/или неионогенных частиц, химические реакции в процессе получения не происходят. Они являются биоразлагаемыми,

следовательно, считаются безвредными для окружающей среды, подвергаются повторной переработке и использованию [58].

В 2011 году в результате метаболомного исследования на основе ядерного магнитного резонанса было показано, что в клетках растений присутствует большое количество простых соединений – сахаров, аминокислот, холина и органических кислот. Данные первичные метаболиты растениям необходимы для повышения устойчивости в экстремальных условиях. Это легло в основу теории о том, что данные соединения образуют среду отличную от воды и липидов, образуя третий тип среды для растворения веществ в растениях [2]. Смеси, которые образуют такой тип среды, обозначают как «природные глубокие эвтектические растворители» (Natural Deep Eutectic Solvents, NADES). Данная теория связана со свойствами ионных жидкостей и глубоких эвтектических растворителей. Они могут усиливать экстракцию и растворение природных компонентов, а также улучшать химические и ферментативные реакции. Ионные жидкости, DES и NADES хоть и имеют схожие свойства, они отличаются друг от друга.

Природные глубокие эвтектические растворители состоят из двух или более соединений, которые между собой связаны посредством образования межмолекулярных водородных связей и Ван-дер-Ваальсовых сил, в результате термического воздействия на смесь доноров и акцепторов водородных связей в эквимолярном соотношении происходит образование эвтектической фазы, характеризующейся температурой плавления ниже, чем температура плавления каждого компонента отдельно (рис. 4). Соединения, которые входят в состав природных глубоких эвтектических растворителей, являются первичными метаболитами живых клеток [4].

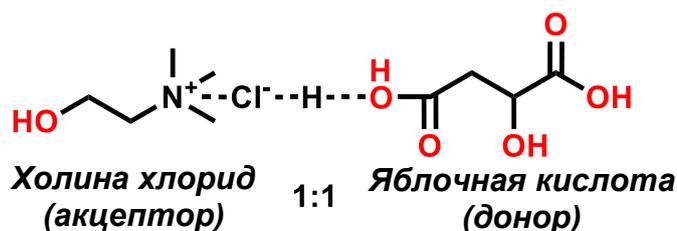


Рисунок 4 – Представление образования межмолекулярных связей между молекулой холина хлорида и яблочной кислоты в мольном соотношении 1:1

Чаще всего в качестве акцепторов используют четвертичные аммонийные соединения, а доноры представлены карбоновыми кислотами, спиртами, углеводами, аминокислотами и др.

NADES обладают двумя механизмами действия как растворители для экстракции: (1) прямым действием (взаимодействие с целевыми соединениями, обычно посредством водородных связей) и (2) непрямым действием (повреждение клеточной стенки, высвобождение целевого соединения из растительного матрикса) [59,60].

1.4.2. Классификация природных глубоких эвтектических растворителей

Природные глубокие эвтектические растворители чаще всего рассматриваются как отдельный класс растворителей, однако они являются одними из видов глубоких эвтектических растворителей, так как имеют схожий принцип строения, свойства, однако отличаются по составу.

Общей формулой всех глубоких эвтектических растворителей является Cat^+X_zY , где катионом выступает аммоний, фосфоний или сульфоний, X представляет собой основание Льюиса (обычно в виде галогенид-иона), тогда как Y является кислотой Льюиса или Бренстеда и z – число молекул, которое взаимодействует с определенным анионом (рис. 5) [61].

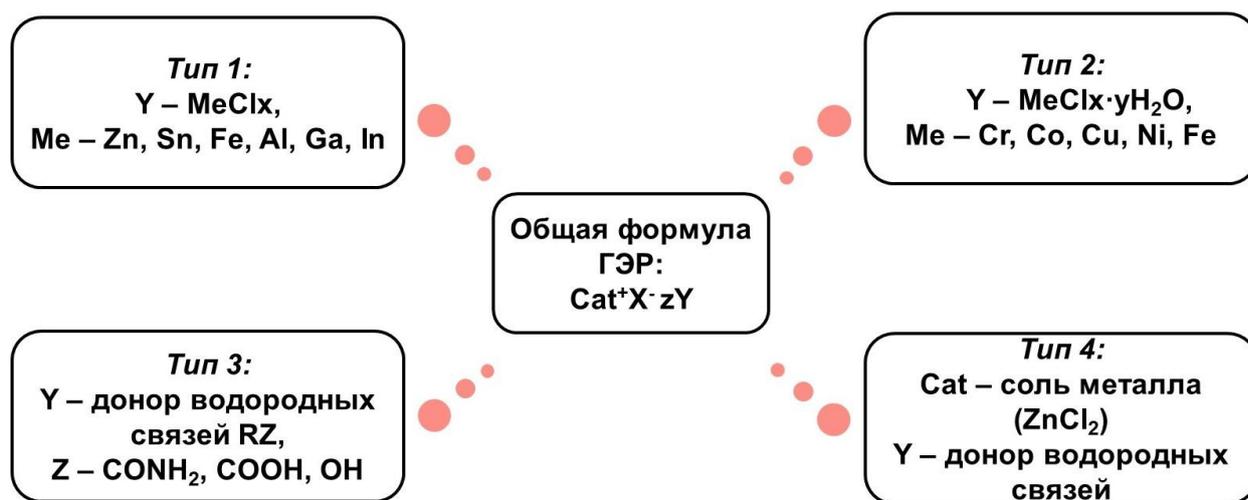


Рисунок 5 – Классификация глубоких эвтектических растворителей [61-63]

К 1 типу глубоких эвтектических растворителей относятся системы, в которых катион представляют собой имидазолиевую соль, соль хлоралюмината, а анион – галогениды цинка, селена, железа (II), алюминия, галлия, индия и других.

В состав DES 2 типа входит соль холина хлорида в качестве катиона, а также гидратированные галогениды металлов: хрома, кобальта, меди, никеля и железа в качестве аниона.

Природные глубокие эвтектические растворители часто относят к 3 типу, так как катионом является холин и т.д., анионом – хлорид, бромид, а в качестве кислоты Льюиса/Бренстеда выступает донор водородных связей, представляющий собой амид, спирт, карбоновую кислоту, аминокислоту или сахар [4]. Наглядно показано взаимодействие таких компонентов на рис. 6.

К 4 типу относят смеси хлорида цинка с мочевиной, ацетамидом, этиленгликолем, 1,6-гександиолом [63].

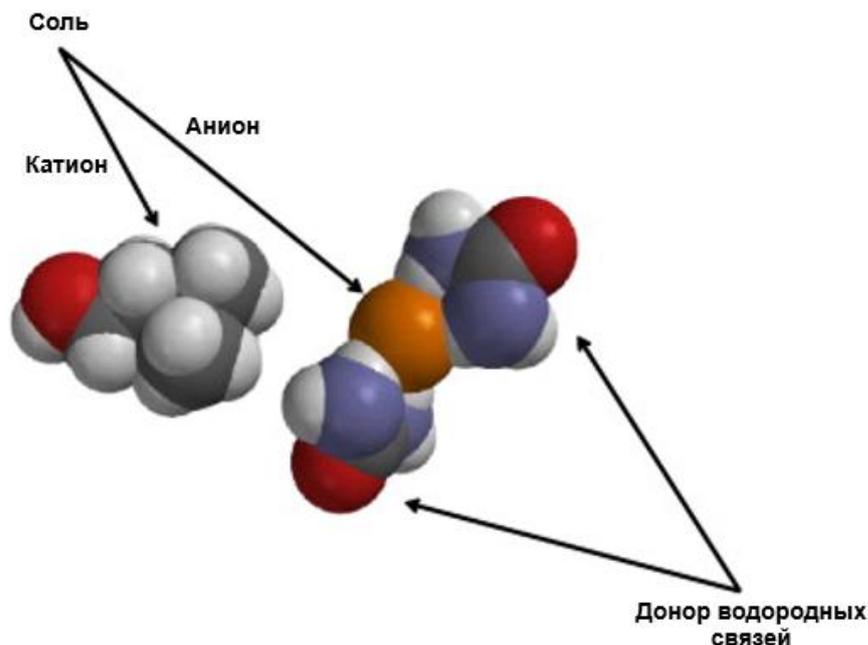


Рисунок 6 – Взаимодействие компонентов природных глубоких эвтектических растворителей (адаптировано по материалам [64])

NADES не всегда можно отнести к данному типу. В целом, природные глубокие эвтектические растворители классифицируют на пять групп [65]:

- Ионные жидкости, состоящие из кислоты и основания (яблочная кислота и холина хлорид);
- Нейтральные NADES, состоящие только из сахаров или сахара с другим многоатомным спиртом (глюкоза – фруктоза);
- Нейтральные NADES, состоящие из сахара/многоатомного спирта и органической кислоты (глюкоза – молочная кислота);
- Нейтральные NADES, состоящие из сахара/многоатомного спирта и органического основания (сорбитол – холина хлорид);
- NADES, состоящие из аминокислоты и сахара/органической кислоты (пролин – глюкоза [66]).

Как можно отметить, некоторые группы включают в себя только нейтральные компоненты (как например, сахара), следовательно, такие NADES нельзя отнести к вышеуказанным 3 типу глубоких эвтектических растворителей (рис. 5). В результате, такие NADES были отнесены к 5 типу

глубоких эвтектических растворителей, состоящие из неионогенных частиц [67].

1.4.3. Методы приготовления природных глубоких эвтектических растворителей

Глубокие эвтектические растворители, а, следовательно, и природные глубокие эвтектические растворители, можно получить с помощью метода лиофилизации [68], соизмельчения [69], нагревания, выпаривания [4], с использованием микроволнового нагревания, с использованием ультразвука [70]. Стоит отметить, что при приготовлении DES не происходит химической реакции, следовательно, процесс приготовления нельзя назвать синтезом. Необходимо учитывать до приготовления несколько факторов, таких как чистоту и содержание воды в исходных веществах, а также хранение и сушку. Без учета данных факторов возможно изменение физико-химических свойств готовых растворителей, что существенным образом будет влиять на результат. Холина хлорид, карбоновые кислоты обладают высокой гигроскопичностью, следовательно, необходимо хранить такие реагенты без доступа к влаге, в противном случае, влага может привести к неточным стехиометрическим расчетам [71]. Характеристика и условия проведения данных методов приведена в таблице 2.

Таблица 2. Методы приготовления DES/NADES

Метод приготовления	Характеристика метода	Источник
Лиофилизация	Замораживание водных растворов компонентов с последующей лиофилизацией до образования прозрачной жидкости	[68]
Соизмельчение	Сначала происходит сушка, затем смешивание компонентов и их последующее измельчение в ступке с пестиком при комнатной температуре до образования гомогенной жидкости	[69]
Нагревание и перемешивание	Смешивание компонентов, нагревание до образования прозрачной жидкости	[4]
Выпаривание	Компоненты растворяют в воде и выпаривают при нагревании в ротационном испарителе с последующим помещением полученной жидкости	[4]

	в эксикатор для высушивания до постоянной массы	
Микроволновой нагрев	Смесь компонентов при микроволновом излучении образует прозрачную жидкостью	[72]
Ультразвуковая обработка	Ультразвуковая обработка способствует взаимодействию между ДВС и АВС, что приводит к образованию прозрачной жидкости	[70]

Метод нагревания состоит в том, что при воздействии температуры и постоянном перемешивании смеси компонентов образуется гомогенный раствор [73], однако температура нагрева должна находиться в пределах от 50 до 100 °С, так как более высокая температура может приводить к разрушению вследствие реакции этерификации. Было обнаружено, что глубокие эвтектические растворители могут разлагаться вследствие реакции этерификации, главным образом между карбоновой кислотой и спиртовой группой холина хлорида. Реакция этерификации может осуществляться даже при комнатной температуре в течение продолжительного периода времени и может ускоряться при повышенных температурах [74]. Метод нагревания является наиболее простым, так как для его осуществления не требуется сложная аппаратура. Однако в процессе нагревания могут происходить не только этерификация, но и разложение, улетучивание, окисление и другие побочные реакции. Следовательно, необходим тщательный выбор температуры и времени нагрева для обеспечения чистоты и стабильности NADES [75].

С помощью метода выпаривания возможно получение NADES при более низкой температуре и за более короткое время. Данный метод позволяет получить природные глубокие эвтектические растворители, компоненты которых обладают высокими температурами плавления. При таком методе не наблюдается этерификация [71]. Однако образцы NADES, полученные таким образом, могут содержать большое количество воды (10-13%) [75].

Образование эвтектического растворителя, состоящего из холина хлорида и органической кислоты, при использовании метода лиофилизации происходит в процессе замораживания в среде жидкого азота (при

температуре – 40°C) в течение 4 часов, затем лиофилизации при температуре – 78 °C. Такой процесс необходим для максимального удаления воды из образующегося растворителя. NADES будет получен путем сублимации льда в пар при низкой температуре и низком давлении, что является методом выбора для термолабильных компонентов, которые могут подвергаться реакции этерификации. Данный процесс является трудоемким, однако образуется NADES с высокой степенью чистоты и малым процентом содержания воды (1-3%) [75].

Метод микроволнового облучения позволяет уменьшить время и энергетические затраты, следовательно, является быстрым, дешевым, простым и экологически чистым способом приготовления NADES. Однако необходимо тщательно подбирать условия приготовления, такие как время нагрева и мощность для того, чтобы предотвратить побочные реакции, которые могут привести к разложению компонентов [71,72].

При ультразвуковой обработке звуковые волны вызывают кавитацию, которая заключается в образовании и коллапсе пузырьков. Когда пузырек достигает критического размера и взрывается, происходит резкое выделение большого количества тепла и повышение давления, при этом высвобождается энергия. Эта энергия приводит к образованию гомогенной смеси NADES [45]. Примечательно, что при таком способе приготовления растворители стабильны во времени и не подвергаются кристаллизации [71].

1.4.4. Физико-химические свойства природных глубоких эвтектических растворителей

Многие исследования связаны с изучением нового класса растворителей – их строением, а также изучением их физико-химических свойств. В связи с тем, что открыты растворители были сравнительно недавно, данные с каждым днем увеличиваются и появляется новая информация о свойствах. Для оценки влияния природных глубоких эвтектических растворителей на экстракцию

биологически активных веществ необходимо исследовать физико-химические свойства, которые связаны с фазовым поведением, вязкостью, ионной проводимостью, полярностью, рН и поверхностным натяжением. Предположительно, оценка свойств позволит определить наиболее подходящий состав NADES для конкретных соединений. Однако следует учитывать, что необходимо знать свойства экстрагируемых веществ [66].

Фазовое поведение

Образование природных глубоких эвтектических растворителей можно описать с помощью фазовой диаграммы твердое тело – жидкость (рис. 7 а, б) [61]. Фазовая диаграмма показывает температуру плавления в зависимости от состава смеси. Эвтектическая точка E представляет состав и минимальную температуру плавления, при которой сходятся кривые плавления обоих компонентов (рис. 7 а). При этом не любые смеси являются «глубокими» эвтектическими растворителями, а только те смеси, у которых температура эвтектической точки (T_E) ниже идеальной температуры жидкой эвтектики (рис. 7 б) с точки зрения термодинамической природы. Температурная депрессия (ΔT_2) определяется для NADES как разница между идеальной (T_E *идеальная*) и реальной (T_E *реальная*) температурами эвтектической точки. Тогда как температурная депрессия (ΔT_1) охватывает по существу любую смесь соединений, исключая твердые растворы или стабильные промежуточные соединения, у которых температура плавления чистых компонентов сравнима с температурой плавления смеси [76].

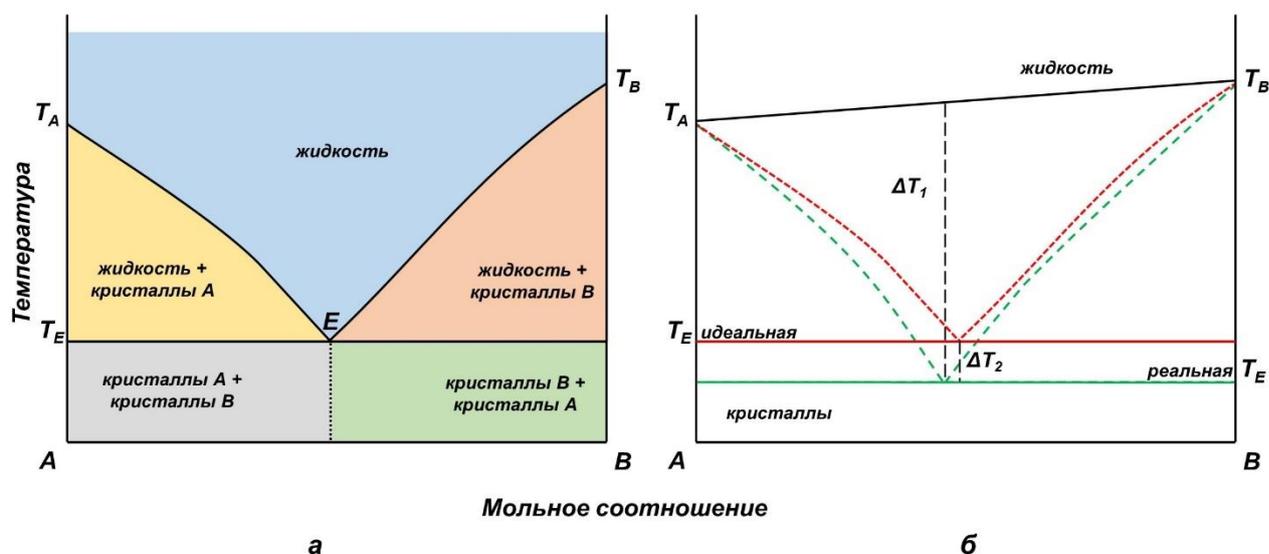


Рисунок 7 – Фазовая диаграмма двухкомпонентной системы
(а – идеальной эвтектической смеси, б – глубокого эвтектического растворителя)

NADES является эвтектической смесью, поведение которой отличается от идеального термодинамического. Данное поведение объясняется наличием сильного взаимодействия доноров и акцепторов водородных связей с образованием плотной сети молекул [77].

Вязкость

Природные глубокие эвтектические растворители чаще всего имеют высокую вязкость. Это обусловлено наличием обширной сети водородных связей между компонентами, которая ограничивает подвижность свободных частиц внутри молекул растворителя. NADES обладают высокой вязкостью, в том числе за счет наличия Ван-дер-Ваальсовых сил и электростатического взаимодействия [78]. Вязкость не только зависит от наличия межмолекулярного взаимодействия, но и от стерических эффектов. Вязкость ионных и молекулярных жидкостей может быть обусловлена наличием в свободном объеме «полостей» подходящих размеров, в которые могут переместиться молекулы/ионы растворителя [79]. Такие «полости» возникают при плавлении из-за тепловых колебаний, они имеют произвольный размер и

расположение. Чем больше будут «полости», тем менее вязким будет растворитель, вследствие наличия свободного ионного движения [80]. Несомненно, на вязкость влияют химическая природа исходных компонентов, молярное соотношение и температура [81].

Вязкость растворителей необходимо принимать во внимание при проведении экстракции биологически активных веществ. Высокая вязкость может препятствовать массопереносу веществ из растительной матрицы [66]. Однако снизить вязкость можно при помощи добавления определенного количества воды. В результате разбавления изначальных составов NADES происходит постепенное ослабевание водородных связей между компонентами. При этом надмолекулярная структура растворителей сохраняется в том случае, если количество добавляемой воды составляет не более 50% (по объему) [5].

pH

Водородный показатель для неводных растворителей зависит от химического потенциала водорода. На химический потенциал влияет присутствие катионов и анионов. Для NADES значение pH определяется молекулярным взаимодействием, то есть образованием водородных связей ионов с другими частицами в растворителе.

Кислотность NADES сильно зависит от типа донора водородной связи. Очевидно, что наличие кислоты в виде ДВС объясняет низкие значения водородного показателя [66]. Добавление воды в состав растворителя способствует увеличению pH [82].

Поверхностное натяжение

Высока важность оценки и поверхностного натяжения природных глубоких эвтектических растворителей. Поверхностное натяжение сильно зависит от интенсивности межмолекулярного взаимодействия. Кроме того, на поверхностное натяжение влияют мольная доля соли и тип катиона, поскольку

дополнительная гидроксильная группа или более длинная алкильная цепь в четвертичной аммонийной соли приводит к более высокому поверхностному натяжению. При повышении температуры поверхностное натяжение уменьшается [61].

Экстрагирующая способность

Важной особенностью природных глубоких эвтектических растворителей является то, что они способны экстрагировать биологически активные соединения мало или нерастворимые в воде. Это объясняется тем, что они могут принимать и переносить протоны и электроны, образуя водородные связи с соединениями и извлекать их из растительной матрицы [83]. NADES успешно применяются как для экстракции полярных, так и неполярных соединений из сельскохозяйственных и лекарственных растений, продуктов рыбного хозяйства и морских водорослей, например, иридоидов [84], антрахинонов и процианидинов [85–87], таншинонов [88], флавоноидов [89], кумаринов [90], дубильных веществ [91], куркумина [92], каротиноидов, жирных кислот [93], фукоксантина [91], белков [94], алкалоидов [95], терпенов [96] и т. п.

Наибольший интерес для нас представляют исследования природных глубоких эвтектических растворителей для извлечения сапонинов вследствие того, что данная группа является одной из преобладающих в аралии маньчжурской. Информация о видах лекарственного растительного сырья, маркерных БАВ, методах и условиях проведения экстракции представлена в таблице 3. В данных исследованиях были выбраны оптимальные составы NADES для извлечения различных сапонинов.

Таблица 3. Примеры использования NADES для извлечения различных сапонинов

Лекарственное растительное сырье	БАВ (маркеры для анализа)	Оптимальный состав NADES (молярное соотношение и процент содержания воды)	Метод экстракции	Условия проведения экстракции	Источник
Порошок <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Азиатикозид, мадекассосид	Ацетилхолина хлорид – лимонная кислота – вода (1:2:2)	Микроволновая экстракция	К порошку сырья добавляли DES в соотношении 1:20, перемешивали, обрабатывали в микроволновой печи в течение 20 секунд при мощности 450 Вт	[97]
Корни <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (порошок)	Глицирризиновая кислота	Холин хлорид – молочная кислота – вода (1:1+30%)	Мацерация с перемешиванием	Порошок смешивали с растворителем в соотношении 1:40, перемешивали при 30 °С, 400 об/мин в течение 60 минут. После обработки отделяли сырье и извлечение разбавляли водой	[98]
Порошок <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Глицирризиновая кислота	Холин хлорид – молочная кислота – вода (1:1+30%)	УЗЭ	Смесь в соотношении 1:30 подвергали ультразвуковой обработке при мощности 20-100 Вт в течение 30 минут и 30 °С. Частота составила 22 кГц. После обработки отделяли сырье и извлечение разбавляли водой	[99]
Кора <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	Сумма сапонинов	Холин хлорид – пропионовая кислота – этанол (2:1+42%)	Мацерация с перемешиванием	Смесь сырья и DES нагревали при температуре 40 °С, скорости перемешивания 120 об/мин в течение 24 часов. Соотношение сырье-экстрагент 1:15	[100]
Отходы <i>Agave sisalana</i> Perrine		Холин хлорид – уксусная кислота – вода (2:1+19%)			
Корни и корневища <i>Panax notoginseng</i> (Burkill) F.H. Chen	Гинсенозид Rg1, Rb1, нотогинсенозид R1	Холин хлорид – N.N'-диметилмочевина (1:1),	УЗЭ	25 мг порошка и 1 мл NADES (+25% воды) обрабатывали ультразвуком	[6]

		L-пролин – 1-метилмочевина (1:1)		(мощность 200 Вт, частоте 40 кГц) в течение 30 минут при 50 °С	
Листья <i>Ginkgo biloba</i> L.	Билобалид, гинкголид А, В и С, гинкголевая кислота С13:0, С15:1 и С17:1	Холина хлорид – яблочная кислота – вода (1:1+20%), глицерин – пролин – сахароза – вода (9:4:1+20%)	Мацерация с ультразвуковой обработкой	Порошок (200,0 мг) смешивали с 4 мл NADES, перемешивали в течение 1 минуты, нагревали на водяной бане при 40 °С в течение 1 часа, обрабатывали ультразвуком при комнатной температуре в течение 30 мин	[101]
Листья и стебли <i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer	Гинсенозиды Rb1, Rb2, Rb3, Re, Rg1, Rg2 и Rg3	Холина хлорид – яблочная кислота – вода (1:1+20%), Глюкоза – яблочная кислота – вода (1:1+20%)			
Выжимка из семян <i>Camellia oleifera</i> Abel.	Чайный сапонин	L-пролин – глицерин – сахароза – вода (4:10:1+30%)	УЗЭ	100 мг порошка и 1 мл NADES обрабатывали ультразвуком (при мощности 100 Вт) в течение 30 минут при 60 °С, проводили экстракцию одной порции сырья несколько раз	[102]
Корневища <i>Dioscorea nipponica</i> Makino	Протодиосцин, протограциллин, псевдопротодиосцин, псевдопротограциллин	Холина хлорид – малоновая кислота – вода (1:1+54%)	УЗЭ	50 мг порошка и 1 мл NADES (с 30% воды) обрабатывали ультразвуком (при мощности 300 Вт и частоте 40 кГц) в течение 20 минут при комнатной температуре	[103]
Корневища <i>Trillium govanianum</i> Wall. ex D.Don	Стероидные сапонины (борассозид Е, борассозид D, протодисцин, пенногенин дигликозид, пенногенин тетрагликозид, прегнахакотриозид, гованозид В)	Холин хлорид – молочная кислота (1:1)	УЗЭ	Порошок и растворитель в соотношении 1:20 обрабатывали ультразвуком при 200 Вт, 40 кГц, 50 °С в течение 60 минут. Осадок сырья отделяли, к 100 мкл полученного извлечения добавляли 900 мкл метанола	[104]
Корневища и корни <i>Eleutherococcus</i> <i>senticosus</i> (Rupr. & Maxim.) Maxim.	Комплекс соединений (фенилпропаноиды, производные карбоновых кислот, алкалоиды, терпеноиды, аминокислоты,	Холин хлорид – молочная кислота – вода (1:1+20%)	УЗЭ	Порошок с растворителем в соотношении 1:20 обрабатывали ультразвуком в течение 60 минут при 40°С, 500 Вт. Отбирали аликвоту	[7]

	фенольные соединения, стероиды, флавоноиды, амиды)			1 мл и довели до 10 мл водой и фильтровали	
Корневища <i>Polygonatum cyrtonema</i> Hua	Стероидные сапонины	Холин хлорид – молочная кислота – вода (1:1+30%)	Перемешивание с кварцевым песком	Флакон с порошком, кварцевым песком, растворителем помещали в водяную баню. Экстракцию проводили с помощью диспергатора в течение 60 минут	[105]
Корни и корневища <i>Panax notoginseng</i> (Burkill) F.H.Chen	Гинсенозид Rg1, Rb1, нотогинсенозид R1	Холин хлорид – мочевины (1:2+45%)	УЗЭ	25 мг образца порошка взвешивали и смешивали с 1 мл растворителя. Смесь подвергалась ультразвуковой обработке при 50 °С в течение 30 мин. После обработки смесь центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин. Собирали полученную надосадочную жидкость, подвергали фильтрации через мембрану толщиной 0,45 мкм.	[106]
Выжимка из семян <i>Camellia oleifera</i> Abel.	Чайный сапонин	Бетаин – этиленгликоль (1:3)	УЗЭ	0,1 г образца добавляли к 10 мл водосодержащего DES и перемешивали в шейкере. Затем смесь подвергали ультразвуковой обработке (40% мощность, 20 мин) и центрифугировали.	[107]
Выжимка из семян <i>Camellia oleifera</i> Abel.	Чайный сапонин	Холин хлорид – метилмочевина (1:1+20%)	Мацерация с перемешиванием	1 г образца и 20 мл DES смешивали и экстрагировали путем перемешивания на водяной бане при 60°С в течение 1 часа. После экстракции экстракты центрифугировали в течение 15 мин и анализировали надосадочную жидкость	[108]
Порошок <i>Polygonatum sibiricum</i> F.Delaroche	Сапонин Rb1	Масляная кислота – мочевины (4:1+40%)	УЗЭ	NADES (1,5 мл), 15 мг FeCl ₃ и 100 мг образца добавляли в центрифужную пробирку. Обработывали в	[109]

				<p>ультразвуковой ванне (30°C, 40 Гц) в течение 30 минут.</p> <p>После центрифугирования (5 мин) экстракт (1,4 мл) поместили в другую центрифужную пробирку. Затем было добавлено 56 мг NaCl для снижения растворимости NADES, экстракт был разделен на верхнюю фазу NADES и нижнюю водную фазу. Водную фазу лиофилизировали.</p>	
<p>Порошок семян <i>Camellia oleifera</i> Abel.</p>	Сумма сапонинов	Пролин – глицерин (2:5)	Мацерация с перемешиванием	<p>50 г порошка и 500 мл NADES перемешивали при 180 об/мин, 60°C в течение 2 ч во вращающемся шейкере, а затем центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость собирали, а остаток экстрагировали повторно. Затем экстракты объединяли и адсорбировали макропористой смолой D-101 и смесь перемешивали при 120 об/мин в течение 24 ч. Добавляли 75% этанол и концентрировали.</p>	[110]
<p>Порошок стеблей <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.</p>	Азиатикозид	Бетаин – леволиновая кислота (1:2+30%)	УЗЭ	<p>0,1 г смешивали с NADES в центрифужной пробирке и помещали на ультразвуковую баню (32 мин, 36°C, 140 Вт). После экстракции смесь центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость, фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм). Жидкость с целевым соединением разбавляли метанолом, а затем еще раз фильтровали.</p>	[111]

<p>Кожура <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.</p>	<p>3-<i>O</i>-β-D-глюкопиранозил-(1 → 3)-α-L-арабинопиранозил-фитолаккагеновой кислоты 28-<i>O</i>-β-D-глюкопиранозил, эфир 3-<i>O</i>-α-L-арабинопиранозил фитолаккагеновой кислоты 28-<i>O</i>-β-D-глюкопиранозила</p>	<p>Холина хлорид – 1,2-пропиленгликоль (1:1+40%)</p>	<p>УЗЭ</p>	<p>Сапонины экстрагировали ультразвуком (89 мин, 75°C), а затем центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 минут. Отбирали надосадочную жидкость, разбавляли и определяли содержание сапонинов.</p>	<p>[112]</p>
<p>Ямс <i>Dioscorea opposita</i> Thunb.</p>	<p>Протодиосцин, диосцин, диосгенин</p>	<p>Холин хлорид – акриловая кислота (1:2+24%)</p>	<p>УЗЭ</p>	<p>0,5 г порошка фиолетового ямса и 20 мл NADES обрабатывали ультразвуком (81 °С, 85 мин). После охлаждения разбавляли экстракт водой (экстракт/вода, 2:1, об/об), фильтровали через мембрану 0,22 мкм, центрифугировали (12 000 об/мин, 10 мин).</p>	<p>[113]</p>

Сокращения: УЗЭ – ультразвуковая экстракция

Как можно заметить, чаще всего оптимальным растворителем выступает NADES, в составе которого акцептор – холина хлорид и донор – карбоновая кислота (яблочная, малоновая, молочная) в различном молярном соотношении. В качестве метода экстракции чаще всего использовался метод ультразвуковой обработки.

1.4.5. Преимущества и ограничения применения природных глубоких эвтектических растворителей

В зависимости от различных физико-химических свойств растворителей у такого класса существуют преимущества и ограничения для применения в процессе экстракции.

Среди преимуществ нового класса растворителей следует выделить:

- низкая летучесть

Данный класс растворителей, а, следовательно, получаемые экстракты имеют практически нулевое давление паров над поверхностью. Благодаря чему NADES не обладают раздражающим действием при вдыхании персонала, снижаются затраты на специальное оборудование по улавливанию и рекуперации паров легколетучих растворителей.

- невоспламеняемость, взрывобезопасность

Данное свойство NADES уменьшает вероятность возникновения пожароопасных ситуаций. Также позволяет снизить экономические затраты на производстве продукции.

- биоразлагаемость

По данным исследования К. Radošević и соавторов (2015) данные смеси классифицированы как «легко биоразлагаемые» в связи с их высоким уровнем минерализации (68-96%) [114].

- доступность и низкая стоимость компонентов

Компоненты для получения NADES используются в других областях промышленности: пищевой, косметической и др.

- простота и безотходность получения

Следует отметить, что NADES получают в одну стадию и без образования побочных продуктов реакции.

- термическая и химическая стабильность

Доказано, что составы NADES являются стабильными при температуре до 170 °C [115].

- широкий диапазон полярности

Изменяя состав и условия экстракции можно извлекать широкий диапазон БАВ от гидрофильных до липофильных [12].

- возможность «настройки» свойств для решения конкретных задач

Существует возможность регулирования физико-химических свойств посредством добавления воды, изменения молярного соотношения компонентов [11,116].

К ограничениям NADES относятся:

- высокая вязкость

Растворители могут замедлять массообменные процессы при экстракции. Однако это можно преодолеть добавлением воды, при этом вязкость будет снижаться. Также вязкость может снижаться из-за усиления межмолекулярного взаимодействия при высоких температурах и структурных повреждениях, вызываемых тепловым расширением [116].

- низкая летучесть

Низкая летучесть ограничивает возможности удаление NADES путем упаривания [101].

ВЫВОДЫ ГЛАВЫ 1

В литературном обзоре приведены ботаническое описание аралии маньчжурской, химический состав, экспериментально установленная фармакологическая активность соединений, препараты на основе данного растения. Стоит отметить, что этиловый спирт, используемый для производства настойки аралии, является фармакологически неиндифферентным, пожаро- и взрывоопасным веществом, требует строгого учета на производстве.

В связи с тем, что сырье аралии представляет собой корни, то есть грубую анатомическую структуру, в которой затруднен массообмен, при разработке технологии необходимо использование различных методов, позволяющих повысить эффективность извлечения биологически активных веществ. Интерес представляет применение новых экстрагентов – природных глубоких эвтектических растворителей. NADES доказано повышают эффективность извлечения сапонинов из различных видов растительного сырья. В литературе нет сведения о возможности применения NADES для экстракции метаболитов из корней аралии маньчжурской.

Для использования природных глубоких эвтектических растворителей немаловажным является характеристика и оценка физико-химических свойств, а также подбор методов, с помощью которых возможно их получение. Тщательный подбор подходящей комбинации акцепторов и доноров водородных связей важны для обеспечения стабильности получаемого состава. Одним из ограничений применения NADES является высокая вязкость. Растворители могут замедлять массообменные процессы при экстракции. Следовательно, для повышения эффективности извлечения БАВ необходима интенсификация процесса экстракции.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный объект

Объектом исследования являлось лекарственное растительное сырье - корни аралии маньчжурской (*Araliae elatae radices*) (ГФ XIV ФС.2.5.0058.18 аралии маньчжурской корни) семейства Аралиевые (*Araliaceae*). Внешний вид растения представлен на рис. 8. Сырье было собрано в питомнике растений города Хабаровска (Дальний Восток) и поставлено фирмой «Женьшень» (серия 0051-51) в 2021 году.



Рисунок 8 – Внешний вид растения Аралии маньчжурской

Сырье анализировали в соответствии с требованиями фармакопейной статьи. Согласно данным таблицы 4 сырье соответствовало требованиям ГФ РФ XIV издания.

Таблица 4. Результаты анализа полученного сырья

Показатель	Значение показателя (ГФ XIV издания)	Значение показателя (экспериментальное)
Подлинность	Смесь цельных или продольно расщепленных кусков корней длиной до 8 см и диаметром до 3 см, с	Соответствует

	<p>немногочисленными мелкими боковыми корнями. Корни легкие, продольно-морщинистые, с сильно шелушащейся пробкой. Кора тонкая, легко отделяется от древесины. Излом корня занозистый. Цвет корней снаружи коричневато-серый, на изломе беловато- или желтовато-серый. Запах специфический. Вкус водного извлечения слегка вяжущий, горьковатый.</p>	
Микроскопические признаки	<p>При рассмотрении поперечного среза должен быть виден слой сильно шелушащейся пробки. Наружная кора состоит из тонкостенных овальных клеток паренхимы, в которых ближе к пробке встречаются друзы оксалата кальция. Также в паренхиме расположены концентрическими поясами секреторные каналы диаметром от 7 до 20 мкм. Паренхимные клетки около секреторных каналов и клетки сердцевинных лучей заполнены крахмальными зёрнами. Крахмальные зёрна простые и 2-8 сложные. Кора отделена от древесины узким слоем камбия. Древесина кольцесосудистая. Сердцевинные лучи одно-пятирядные.</p>	Соответствует
Определение основных групп биологически активных веществ (тонкослойная хроматография)	<p>Должно обнаруживаться не менее двух зон адсорбции красновато-фиолетового или фиолетового цвета, допускается обнаружение других зон адсорбции красновато-фиолетового или фиолетового, а также зон адсорбции другого цвета</p>	Соответствует
Влажность, %	не более 14%	12%
Зола общая, %	не более 7%	6,5%
Зола, не растворимая в хлористоводородной кислоте, %	не более 4%	2%
Кусков корней длиной более 8 см, %	не более 15%	11%
Кусков корней диаметром более 3 см, %	не более 15%	13%
Измельченность сырья (частиц сырья, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, %	не более 5%	1%

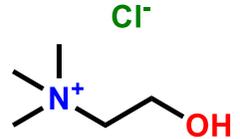
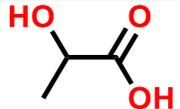
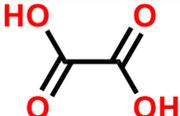
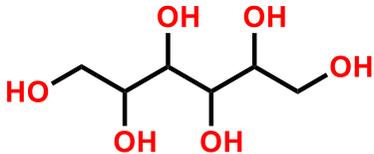
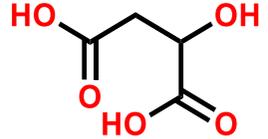
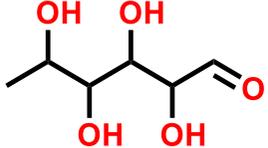
Корней, изменивших окраску в изломе (потемневших), %	не более 4%	1%
Органические примеси, %	не более 1%	0,6%
Минеральные примеси, %	не более 1%	0,3%
Количественное определение (сумма аралозидов в пересчете на аммонийную соль аралозидов А, В, С с усредненной молекулярной массой)	не менее 5%	15%

Перед экстракцией сырье измельчали с помощью роторной ножевой мельницы РМ 120 (ООО «Вибротехник», Россия) до частиц, проходящих сквозь сито с необходимым размером.

2.2. Реактивы (реагенты)

Для получения природных глубоких эвтектических растворителей использовались компоненты в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5. Характеристика компонентов природных глубоких эвтектических растворителей

Наименование	Формула	Молекулярная масса (г/моль)	Качество	Температура плавления, °С	Поставщик
Холина хлорид		139,62	98 %	305	НеваРеактив (Россия), Hefei July Biotechnology Co., ltd (Китай)
L-Молочная кислота		90,07	80 %	53	InnoGreenChem B.V. (Нидерланды)
Щавелевая кислота		90,03	99 %	189,5	НеваРеактив (Россия)
D-Сорбит		182,17	98 %	110-112	НеваРеактив (Россия)
D,L-Яблочная кислота		134,08	98 %	131	НеваРеактив (Россия)
L-Рамноза		90,08	99 %	122	Sigma-Aldrich (США)

Для проведения анализов были использованы реактивы в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6. Характеристика реактивов

Наименование	Качество реактива	Поставщик
Вода	класса «для ВЭЖХ»	-
Спирт этиловый	96,4%	Вектон, Россия
Ацетонитрил	класса «для ВЭЖХ»	Merck KGaA, Германия
		Honeywell Riedel-de Haen, Германия
		Вектон, Россия
Аммония формиат	99% (класса «для ВЭЖХ»)	Merck KGaA, Германия
		Sigma-Aldrich, США
Муравьиная кислота	98% (класса «для ВЭЖХ»)	Merck KGaA, Германия
Трифторуксусная кислота (ТФУ)	класса «для ВЭЖХ»	Вектон, Россия
Аралозид А (CAS-7518-22-1)	≥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).

2.3. Оборудование

В таблицах 7, 8 указаны характеристики оборудования, использованного в процессе проведения исследования.

Таблица 7. Характеристика оборудования

Наименование	Модель	Производитель	Примечание
<i>Подготовка растительного сырья</i>			
Лабораторная просеивающая машина	Cisa RP 200N	Cisa, Испания	-
<i>Приготовление NADES</i>			
Весы лабораторные электронные	CE612-C	ООО «Сартогосм», Россия	-
Магнитная мешалка с подогревом	ММ-5	ООО «Гранат», Россия	-
Микроволновая печь	Rolsen MG2080SN	Rolsen, Россия	-

Термостат	IB-15G	Jeio Tech, Южная Корея	-
<i>Получение извлечений</i>			
Весы аналитические	CE224-C	ООО «Сартогосм», Россия	-
Магнитная мешалка с подогревом	LMS-2003D	Daihan Labtech, Южная Корея	-
Плитка нагревательная	ES- HS3030M	ООО «Экротхим», Россия	-
Ультразвуковая ванна	УЗВ-2,8	ООО «Сапфир», Россия	Мощность генератора 100 Вт, Мощность нагревателя 110 Вт, Рабочая частота 35 кГц
Ультразвуковая ванна	УЗВ-9,5	ООО «Сапфир», Россия	-
Виброкавитационный гомогенизатор	-	-	Лабораторный образец аппарата, разработанный в СПбГТУ (ТИ)
Роторный испаритель	Hei-Vap Advantage ML/G3B	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Германия	-
Микроцентрифуга	5415R	Eppendorf, Германия	-
Центрифуга лабораторная	MPW-351	MPW Med. Instruments, Польша	-
Лиофильная сушилка	FreeZone 2.5	Labconco, США	Пробоподготовка водных и спиртовых вытяжек при -50°C, остаточном давлении 0,5-0,8 мбар

Таблица 8. Характеристика оборудования для анализа

Наименование	Модель	Производитель	Программное обеспечение для обработки результатов
ИК-спектрометр с преобразованием по Фурье	Spectrum 3 Tri-Range FT-IR Spectrometer	PerkinElmer, США	SpectraGryph (версия 1.2.16.1, Германия)
Ротационный вискозиметр	Brookfield DV-III Ultra	Brookfield Engineering Laboratories Inc, США	RheocalcT (АМТЕК Brookfield, США)
<i>Оценка качества</i>			
Высокоэффективный жидкостной хроматограф	Prominence LC-20	Shimadzu Corporation, Япония	LabSolution (Shimadzu Corporation, Япония),

Диодно-матричный детектор	SPD-M20A	Shimadzu Corporation, Япония	Origin 2022 (OriginLab Corporation, США)
<i>Целевой анализ</i>			
Жидкостной хроматограф с масс-спектрометром	SHIMADZU LCMS-9030 System	Shimadzu Corporation, Япония	LabSolution (Shimadzu Corporation, Япония), MSDial (версия 3.12, UC Davis, США)
Ультравысокоэффективная жидкостная хроматографическая система	Waters ACQUITY UPLC I-Class UPLC System	Waters GmbH, Германия	
Тандемный квадрупольно-времяпролетный масс-спектрометр	TripleTOF 6600	ABSciex, Германия	
<i>Нецелевой анализ</i>			
Ультравысокоэффективная жидкостная хроматографическая система	Dionex UltiMate 3000	Thermo Fisher Scientific, Германия	MSDial (версия 4.9, UC Davis, США), Metaboanalyst 5.0 (Wishart Research Group, Канада), Xcalibur Software (версия 4.1, Thermo Scientific, США)
Масс-спектрометр	LTQ-Orbitrap Elite	Thermo Fisher Scientific, Германия	

2.4. Методы физико-химического анализа

2.4.1. Метод спектрометрии в инфракрасной области

Порошки исходных компонентов и образцы NADES анализировали на ИК-спектрометре с Фурье-преобразованием. Измерения проводились в средней ИК-области от 4000 до 400 см⁻¹ в соответствии с ОФС.1.2.1.1.0002 «Спектрометрия в средней инфракрасной области».

2.4.2. Измерение вязкости

Оценка изменения вязкости NADES в зависимости от температуры проводилась на ротационном вискозиметре. Для анализа использовали шпindel LV3 (рис. 9). Нагрев образца до измерения осуществляли в термостате в течение 5-6 часов. В процессе измерения необходимо было подобрать диапазон скоростей вращения шпинделя таким образом, чтобы крутящий момент составлял от 10 до 100%. Когда был выбран диапазон, проводилось измерение вязкости в зависимости от скорости шпинделя.



Рисунок 9 – Измерение вязкости NADES на примере холина хлорида – яблочной кислоты (1:1)

2.4.3. Ультравысокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

Целевой анализ

Анализ тритерпеновых сапонинов в извлечениях проводили при помощи обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии и квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометром с электроспрей ионизацией в режиме негативной ионизации (УВЭЖХ-МС) в условиях, приведенных в таблице 9.

Таблица 9. Условия проведения целевого анализа с помощью УВЭЖХ-МС

Предварительная идентификация (SHIMADZU LCMS-9030 System)	
Параметр	Значение параметра
Колонка	Phenomenex Kinetex C18 (100 x 2.1 мм x 1.7 мкм)
Подвижная фаза А	0,1 % (об/об) муравьиная кислота в сверхчистой воде
Подвижная фаза В	0,1% (об/об) муравьиная кислота в ацетонитриле
Скорость подвижной фазы	0,5 мл/мин
Температура колонки	40 °С

Время анализа	10 мин
Элюентный режим	
Градиентный режим	до 100% подвижной фазы В – 10 мин
Изократический режим	100% подвижной фазы В – 2 мин
Градиентный режим	до 5% подвижной фазы В – 0,1 мин
Изократический режим	5% подвижной фазы – 0,9 мин
Повторная идентификация (Waters ACQUITY UPLC I-Class UPLC System с масс-спектрометром TripleTOF 6600)	
Параметр	Значение параметра
Колонка	EC 150/2 NUCLEOSHELL RP 18 (150 x 2 мм x 2.7 мкм)
Подвижная фаза А	0,3 ммоль/л водный аммония формиат (рН 3,5)
Подвижная фаза В	ацетонитрил
Скорость подвижной фазы	0,4 мл/мин
Температура колонки	40 °С
Время анализа	20 мин
Элюентный режим	
Изократический режим	5% подвижной фазы В – 2 мин
Градиентный режим	до 95% подвижной фазы В – 17 мин
Изократический режим	95% подвижной фазы В – 2 мин
Градиентный режим	до 5% подвижной фазы В – 0,1 мин
Изократический режим	5% подвижной фазы – 3 мин

Нецелевой анализ

Нецелевой анализ метаболитов аралии маньчжурской в извлечениях 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 (УВЭЖХ-МС) в условиях, приведенных в таблице 10.

Таблица 10. Условия проведения нецелевого анализа с помощью УВЭЖХ-МС

Прибор для анализа – Dionex UltiMate 3000 УВЭЖХ система с гибридным LTQ-Orbitrap Elite масс-спектрометром	
Параметр	Значение параметра
Колонка	EC 150/2 Nucleoshell RP18 (150 x 2 мм x 2.7 мкм)
Подвижная фаза А	0,3 ммоль/л аммония формиат (с муравьиной кислотой до рН 3,5)
Подвижная фаза В	ацетонитрил
Скорость подвижной фазы	0,4 мл/мин
Температура колонки	40 °С

Время анализа	30 мин
Элюентный режим	
Изократический режим	5% подвижной фазы В – 2 мин
Градиентный режим	до 95% подвижной фазы В – 17 мин

Анализ в отрицательном режиме был выполнен при напряжении ионного распыления 3,8 кВ с комплектом распылителя и вспомогательных газов до 20 и 10 фунтов на квадратный дюйм соответственно. Температура капилляра была установлена на 275 °С. Анализ в положительном режиме осуществлялся при напряжении ионного распыления 4,0 кВ, с помощью распылителя и вспомогательных газов, установлены на 25 и 21 фунт на квадратный дюйм соответственно. Температура капилляров была установлена на 325 °С.

2.5. 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

3.1. Подготовка NADES

В соответствии с литературными данными, обсужденными в главе 1, мы сравнили три метода приготовления NADES. NADES готовили методом нагревания с перемешиванием (А), ультразвуковой (Б) и микроволновой обработки (В) (рис. 10).

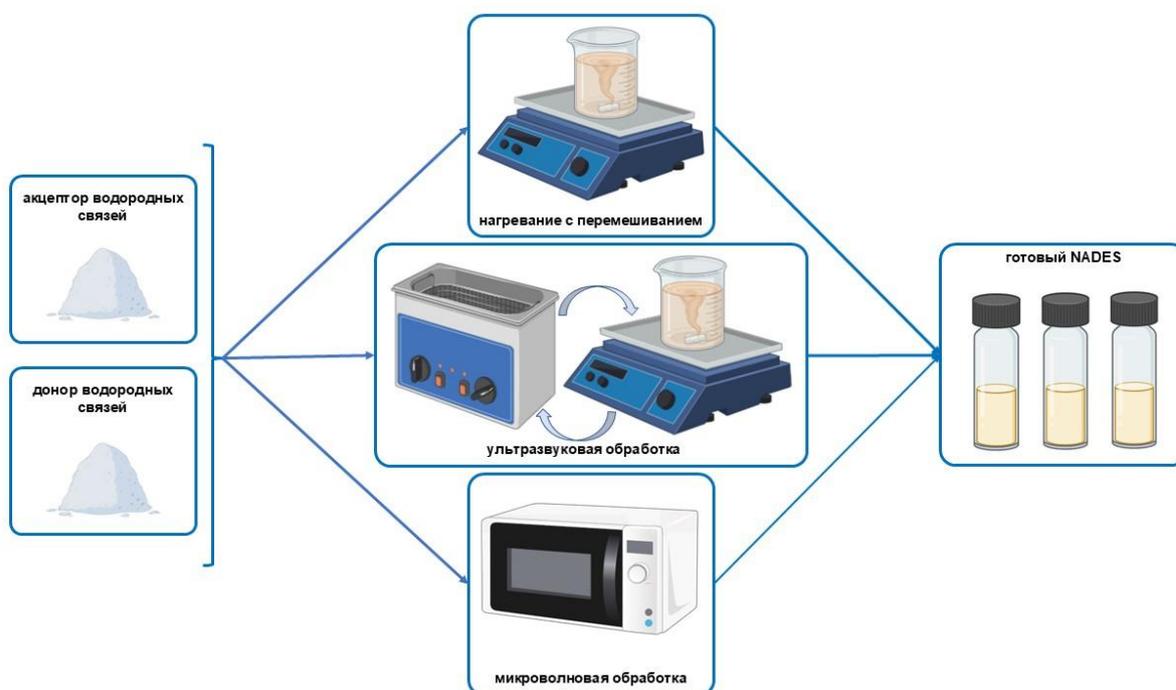


Рисунок 10 – Схематическое изображение методов приготовления NADES
(создано с помощью <https://app.biorender.com/>)

А) Нагревание с перемешиванием

Рассчитанные количества донора и акцептора водородной связи (таблица 11) в зависимости от молярного соотношения компонентов помещали в плоскодонную колбу, перемешивали с помощью стеклянной палочки. Смесь нагревали на магнитной мешалке при температуре 80-90°C до образования прозрачной жидкости [4].

Б) Ультразвуковая обработка

Рассчитанные количества донора и акцептора водородной связи (таблица 11) в зависимости от молярного соотношения помещали в плоскодонную колбу, перемешивали в течение 1 минуты на мешалке при 100 об/мин, затем обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 30 минут при температуре 60 °С. Затем снова перемешивали на мешалке при 100 об/мин, после обрабатывали ультразвуком в течение 15 минут. Процесс повторяли до образования прозрачной жидкости [70].

В) Микроволновая обработка

Рассчитанные количества донора и акцептора водородной связи (таблица 11) в зависимости от молярного соотношения помещали в плоскодонную колбу, перемешивали с помощью стеклянной палочки. Смесь нагревали в микроволновой печи до образования прозрачной жидкости.

Суммарная масса природного глубокого эвтектического растворителя составляла 20,0 г. Полученные образцы растворителей хранили в течение 48 часов при комнатной температуре. Компоненты NADES и их соотношения выбирали, опираясь на литературные данные [4,66,113]. В таблице 11 приведены данные о составах и стабильности приготовленных NADES.

Таблица 11. Составы природных глубоких эвтектических растворителей, приготовленных в ходе работы

Шифр состава	Акцептор водородных связей	Донор водородных связей	Молярное соотношение	Результат при хранении в течение 48 часов после приготовления методом А	Результат при хранении в течение 48 часов после приготовления методом Б	Результат при хранении в течение 48 часов 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
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 удавалось получить однородную смесь. Предположительно, данная температура была недостаточной для сплавления компонентов и образования растворителя, поэтому, мы применяли обработку при более высокой температуре ($\geq 100^\circ\text{C}$) в термостате (в зависимости от температуры плавления компонентов – таблица 5). 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 (рис. 11) были идентичны.

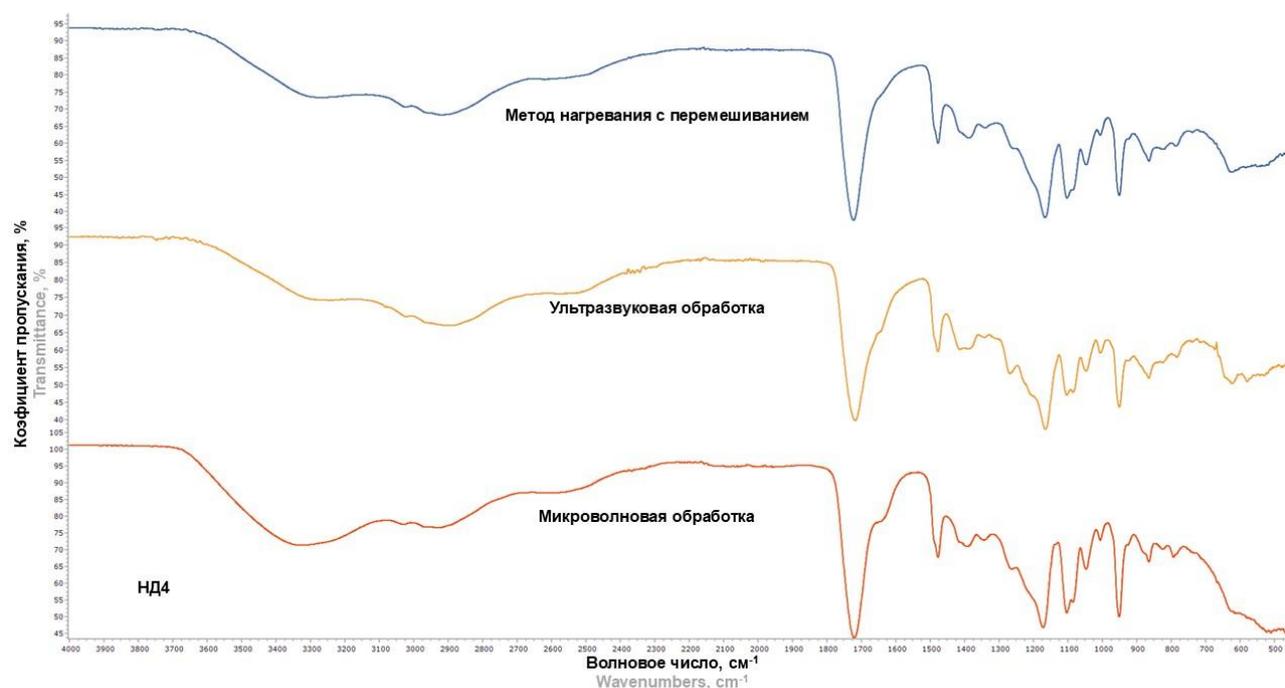


Рисунок 11 – Типичные ИК-спектры растворителя НД4 (холина хлорида – яблочной кислоты, 1:1), полученных различными методами

3.2. Расчеты энергопотребления процесса приготовления растворителей с помощью различных методов

В соответствии со стратегией научно-технологического развития до 2030 года актуален переход к экологически чистой и ресурсосберегающей энергетике. Процесс приготовления NADES является одностадийным и безотходным, побочные продукты не образуются. Все компоненты NADES, использованные нами, получены из природных ресурсов, нетоксичны и могут применяться в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности. Будучи биоразлагаемыми, растворители не наносят вреда экологической системе. В современных исследованиях для оценки ресурсосберегающей энергетике используют расчет энергозатрат процессов. Энергозатраты на процесс приготовления NADES рассчитывали в соответствии с [70, 117].

Для расчета энергозатрат (кВт*ч/г) методов приготовления использовалась формула (1). Данные для расчета приведены в таблице 12.

$$Consumption = \frac{P \cdot t}{m \cdot 1000} \quad (1)$$

где P – мощность оборудования, Вт;

t – время, ч;

m – количество растворителя на выходе, г.

Таблица 12. Энергозатраты процесса приготовления NADES с помощью различных методов

	Нагревание с перемешиванием	Ультразвуковая обработка	Микроволновая обработка
P , Вт	145	195	400
t , ч	4	4	0,067
m , г	20,0		
Энергозатраты, кВт*ч/г	0,029	0,179	0,001

Время приготовления природных глубоких эвтектических растворителей с помощью микроволновой обработки уменьшается с 4 часов до 4 минут, а энергозатраты уменьшаются в 30-180 раз, следовательно, данный метод является наиболее предпочтительным для приготовления NADES.

ВЫВОДЫ ГЛАВЫ 3

В процессе исследования при использовании различных методов получено 19 составов природных глубоких эвтектических растворителей, на основе холина хлорида и сорбита (акцептор водородных связей) и различных кислот (доноры водородной связи). Ряд растворителей оказался нестабилен после хранения в течение 48 часов, и они были исключены из дальнейших исследований. Мы определили, что методы приготовления не влияют на структуру стабильных растворителей. С точки зрения энергетических затрат наиболее предпочтительным является метод приготовления NADES с помощью микроволновой обработки.

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

Следуя принципам «зеленой» химии рационален поиск и замена токсичных и экологически опасных экстрагентов, широко применяемых в технологии фитопрепаратов. Как мы обсудили в главе 1 природные глубокие эвтектические растворители привлекают все больший интерес научного сообщества для извлечения различных классов биологически активных веществ из лекарственного растительного сырья. Эти растворители могут заменить часто используемые этанол, этилацетат, бутанол и другие токсичные органические растворители в технологии лекарственных средств природного происхождения. Учитывая актуальность перехода на «зеленые» энергосберегающие технологии, мы оценили возможность применения NADES для извлечения тритерпеновых сапонинов – основного класса биологически активных веществ аралии маньчжурской, по которым проводится стандартизация настойки аралии, выпускаемой в Российской Федерации.

4.1. Планирование эксперимента

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 11.

Составы NADES были выбраны на основании данных о стабильности, обсужденных в главе 3. Содержание воды, используемое для разбавления некоторых NADES, базируется на данных литературы, которые свидетельствуют об улучшении ряда физико-химических и технологических свойств, таких как вязкость, поверхностное натяжение, плотность [75,118-120]. Добавление воды ослабляет водородные связи, при содержании воды более 50% структура эвтектической смеси разрушается.

Измельченные корни аралии до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,3 мм, помещали в колбу, заливали растворителем в соотношении 1:40. Колбу нагревали на магнитной мешалке при температуре 60 °С в течение 60 минут, скорость вращения магнитной мешалки – 300 об/мин. Извлечение центрифугировали при 5200 об/мин в течение 15 мин. Жидкую фазу передавали на анализ.

Извлекающую способность NADES сравнивали с извлекающей способностью полярного растворителя (воды) и липофильного растворителя (96% этилового спирта). Для сравнения извлекающей способности NADES с водой проводили экстракцию корней аралии в соотношении 1:100 с обратным холодильником в течение 2 часов. Водные извлечения фильтровали, упаривали под вакуумом и лиофилизировали. Спиртовую циркуляционную экстракцию (5 циклов) проводили в аппарате Сокслета при соотношении 1:100. Жидкую фазу отделяли, отгоняли растворители под вакуумом и лиофилизировали.

Все полученные извлечения анализировали с помощью обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии и квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометром с электроспрей ионизацией. Извлечения NADES растворяли в воде (в соотношении 2:3) и помещали в ультразвуковую ванну на 15 мин (35 кГц), 200 мкл центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 об/мин (4°С). 180 мкл анализировали с помощью УВЭЖХ-МС как описано в разделе 2.4.3. (целевой анализ). 10,0 мг каждого водного и спиртового лиофилизата растворяли в 1 мл воды и центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 об/мин (4°С), надосадочную жидкость (180 мкл) анализировали с помощью УВЭЖХ-МС, как описано в разделе 2.4.3. (целевой анализ).

Состав БАВ растений описывается его «метаболомом». Метаболомика является всеобъемлющим анализом, который включает идентификацию и количественную оценку всех метаболитов организма [121]. Условно метаболомное профилирование можно подразделить на два подхода: «целевая»

метабономика, которая предусматривает анализ известных веществ, и «нецелевая» метабономика, включающая анализ известных и неизвестных метаболитов [122].

Для проведения таргетного 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) (таблица 1 приложения 1) [19,123]. Изначально проводилась идентификация извлеченных веществ, основанная на данных, полученных УВЭЖХ-МС с использованием SWATH метода (Sequential Window Acquisition of all Theoretical fragment-ion spectra) - метода измерения масс-спектров всех теоретических ионов-фрагментов при использовании последовательных окон пропускания [124].

4.2. Тритерпеновые сапонины, идентифицированные в извлечениях

Согласно результатам первичного УВЭЖХ-МС анализа были идентифицированы 104 метаболита на уровне MS1. Последующий SWATH метод позволил выявить 25 совпадений, которые можно отнести к производным каулофиллогенина, гедерагенина, а также олеаноловой и эхиноцистовой кислот (таблица 2 приложения 2). Однако анализ MS1 спектров показал, что идентифицированные структуры потенциально могут быть не только целевыми сапонинами, но и продуктами исходной фрагментации. Для уточнения идентификации использовали тандемный квадрупольно-времяпролетный масс-спектрометр TripleTOF 6600 (ABSciex, Германия) в режиме MS/MS фрагментации. С помощью этого масс-спектрометра сначала были проведены два альтернативных эксперимента с установками SWATH и DDA (Data-dependent acquisitions – результат-зависимые измерения) в сочетании с более длинным градиентом разделения с намерением получить фрагментацию для всех m/z , которые можно рассматривать как предполагаемые предшественники, так и как исходные фрагменты, полученные с помощью прибора Shimadzu (раздел 2.4.3).

Все идентифицированные тритерпеновые сапонины показали хорошо интерпретируемые спектры MS/MS в экспериментах SWATH и DDA. В ходе анализа были исключены некоторые соединения из предварительного списка. Таким образом, на основании характерных особенностей фрагментации и исключения ложноположительных результатов, связанных с фрагментацией в источнике, подтвердили только наличие 20 метаболитов этого класса в корнях аралии маньчжурской (таблица 13) [125]. Наличие метаболитов в различных извлечениях приведено в таблице 14.

Таблица 13. Тритерпеновые сапонины, идентифицированные с помощью обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии и квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометром с электроспрей ионизацией в негативном режиме [125]

№	tR (мин)	m/z [M-H] ⁻ экспериментальное	m/z [M-H] ⁻ расчетное	Элементный состав [M-H] ⁻	Характер фрагментации MS2 – дочерние ионы, m/z (относительная интенсивность, %)	Δm (ppm)	Соединение	Ссылка
1	3,8	911,4993	911,5010	C ₄₇ H ₇₅ O ₁₇ ⁻	455,3507 (20), 617,4041 (15), 749,4472 (15), 911,4993 (100)	1,9	Гуаиацин Б изомер 1	[126]
2	3,8	1235,6107	1235,6066	C ₅₉ H ₉₅ O ₂₇ ⁻	455,3522 (50), 617,4059 (15), 749,4492 (100), 911,5035 (10), 1235,6107 (10)	-3,3	Олеаноловая кислота-3-О-(триглюкопиранозил-1-3-арабинопиранозил)-28-1-глюкопиранозил	
3	3,9	1087,5317	1087,5331	C ₅₃ H ₈₃ O ₂₃ ⁻	455,3509 (10), 701,4265 (5), 925,4814 (15), 1087,5317 (100)	1,3	Калопанакс-сапонин F изомер 1	[127]
4	3,9	1117,5390	1117,5436	C ₅₄ H ₈₅ O ₂₄ ⁻	455,3499 (3), 731,4347 (5), 955,4898 (10), 1117,5390 (100)	4,1	Календулагликозид А	[128]
5	4,0	1249,5869	1249,5859	C ₅₉ H ₉₃ O ₂₈ ⁻	455,3487 (5), 701,4254 (15), 925,4743 (7), 1057,5219 (80), 1087,5337 (50), 1153,5538 (100), 1249,5869 (70)	-0,8	Аралияармозид	[129]
6	4,3	1087,5336	1087,5331	C ₅₃ H ₈₃ O ₂₃ ⁻	455,3509 (10), 701,4265 (5), 925,4814 (15), 1087,55336 (100)	-0,5	Калопанакс-сапонин F изомер 2	[127]
7	4,3	955,4859	955,4908	C ₄₈ H ₇₅ O ₁₉ ⁻	455,3511 (5), 569,379 (5), 793,4317 (15), 955,4859 (100)	5,1	Календулагликозид С изомер 1	[128]
8	4,3	1073,5569	1073,5538	C ₅₃ H ₈₅ O ₂₂ ⁻	455,3518 (50), 617,4052 (20), 749,4485 (30), 911,5022 (100), 1073,5569 (15)	-2,9	Эфир олеаноловой кислоты-3-О-(диглюкопиранозил-1-3-арабинопиранозил)-28-1-глюкопиранозила	

9	4,3	1119,5606	1119,5616	$C_{54}H_{87}O_{24}^-$	455,3521 (5), 617,4057 (5), 749,4490 (7), 911,5019 (100), 1073,5551 (15), 1119,5606 (13)	0,9	Эфир олеаноловой кислоты-3- <i>O</i> -(метилдиокси- тригексопиранозил-1-3- пентопиранозил)-28-1- гексопиранозила	
10	4,4	1057,5249	1057,5225	$C_{52}H_{81}O_{22}^-$	455,3517 (5), 701,4286 (7), 763,4309 (5), 895,4698 (7), 1057,5249 (100)	-2,3	Аралозид В	[130]
11	4,5	1089,5493	1089,5487	$C_{53}H_{85}O_{23}^-$	455,3501 (5), 719,4360 (10), 881,4901 (100), 1043,5437 (12), 1089,5493 (12)	-0,6	Аралиясапонин III	[131]
12	4,6	793,4312	793,438	$C_{42}H_{65}O_{14}^-$	455,3471 (10), 631,3785 (15), 793,4312 (100)	8,6	Эфир олеаноловой кислоты-3- <i>O</i> -(гексозил)-28-1- гексоурионида изомер 1	
13	5,1	955,4899	955,4908	$C_{48}H_{75}O_{19}^-$	455,3511 (5), 569,379 (5), 793,4317 (15), 955,4899 (100)	0,9	Календулагликозид С изомер 2	[128]
14	5,3	925,4805	925,4802	$C_{47}H_{73}O_{18}^-$	455,3508 (2), 569,3831 (5), 731,4366 (20), 925,4803 (100)	0,3	Аралозид А изомер1	[130]
15	5,4	911,5016	911,5010	$C_{47}H_{75}O_{17}^-$	455,3507 (20), 617,4041 (15), 749,4472 (15), 911,5016 (100)	-0,7	Гуаиацин Б изомер 2	[126]
16	5,5	925,4807	925,4802	$C_{47}H_{73}O_{18}^-$	455,3508 (2), 569,3831 (5), 731,4366 (20), 925,4803 (100)	0,5	Аралозид А изомер 2	[130]
17	5,6	895,4696	-	-	455,3508 (5), 551,3731 (5), 895,4696 (100)		Неизвестное производное олеаноловой кислоты	
18	5,6	793,4360	793,4380	$C_{42}H_{65}O_{14}^-$	455,3471 (10), 631,3785 (15), 793,4312 (100)	2,5	Эфир олеаноловой кислоты-3- <i>O</i> -(гексозил)-28-1- гексоурионида изомер 2	
19	5,7	763,4260	763,4274	$C_{41}H_{63}O_{13}^-$	455,3502 (3), 631,3822 (5), 763,4260 (100)	1,8	Олеаноловая кислота 3- <i>O</i> - гексурионид-(1-3- пентафуранозид)	
20	5,8	911,4949	911,5010	$C_{47}H_{75}O_{17}^-$	455,3507 (20), 617,4041 (15), 749,4472 (15), 911,4949 (100)	6,7	Гуаиацин Б изомер 3	[126]

17	Неизвестное производное олеаноловой кислоты	+	+	+	+	+	+	н/о	+	+
18	Эфир олеаноловой кислоты-3- <i>O</i> -(гексозил)-28-1-гексоуронида изомер 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	Олеаноловая кислота 3- <i>O</i> -гексуронид-(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

Результаты идентификации на основании целевого метаболомного профилирования показали, что соединения представляют собой производные олеаноловой кислоты (рис. 12).

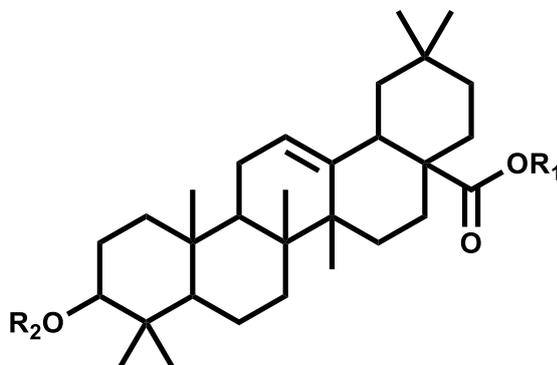


Рисунок 12 – Формула производных олеаноловой кислоты

Среди идентифицированных соединений отмечена группа О-гликозидов олеаноловой кислоты гексозы и пентозы (соединения **1, 2, 8, 9, 11, 15, 19** и **20**), а также несколько производных уроновой кислоты (соединения **3, 4, 6, 7, 10, 12, 13, 14–16** и **18**). Помимо этого, следует учитывать наличие изомеров соединений, которые имели одинаковые m/z , но разное время удерживания (tR), такие как соединения **1, 15, 20; 3** и **6; 7** и **13; 14** и **16**; а также **12** и **18**. Большинство соединений ранее были обнаружены в корнях аралии маньчжурской [19], однако метаболиты **1, 3, 4–7, 13, 15** и **20** были идентифицированы в этом органе впервые. Так, ранее охарактеризованные метаболиты **1, 4, 5, 6, 15** и **20** были обнаружены в листьях, соединение **3** – в стебле, а **7** и **13** – в листьях и почках [19,132].

Практически все идентифицированные тритерпеновые сапонины были обнаружены как в NADES, так и в водном и спиртовом извлечениях (таблица 14). 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**.

4.3. 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). Типичные хроматограммы NADES извлечений представлены на рис. 13.

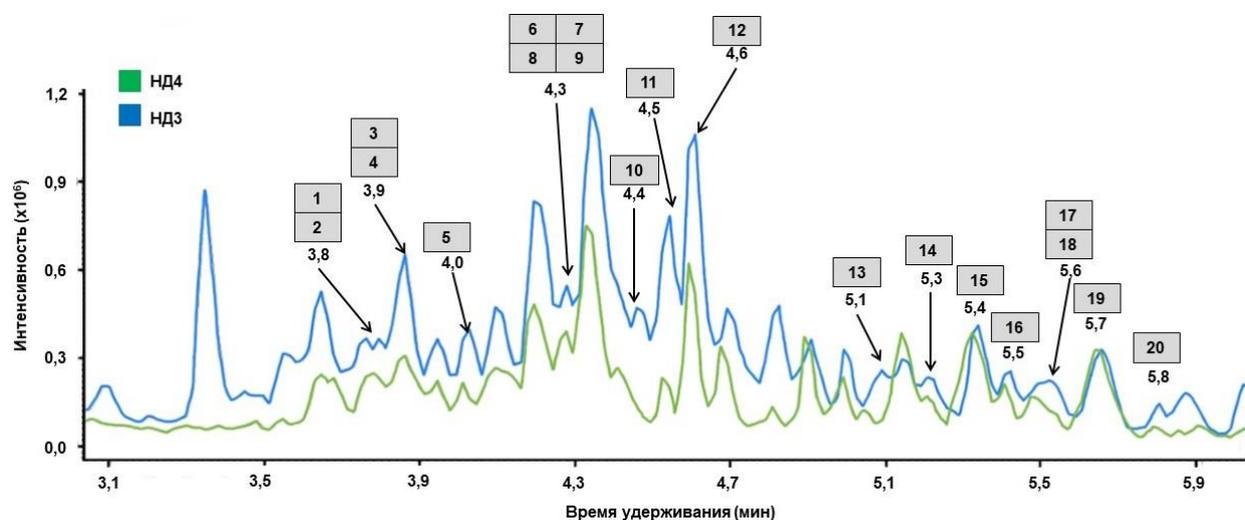
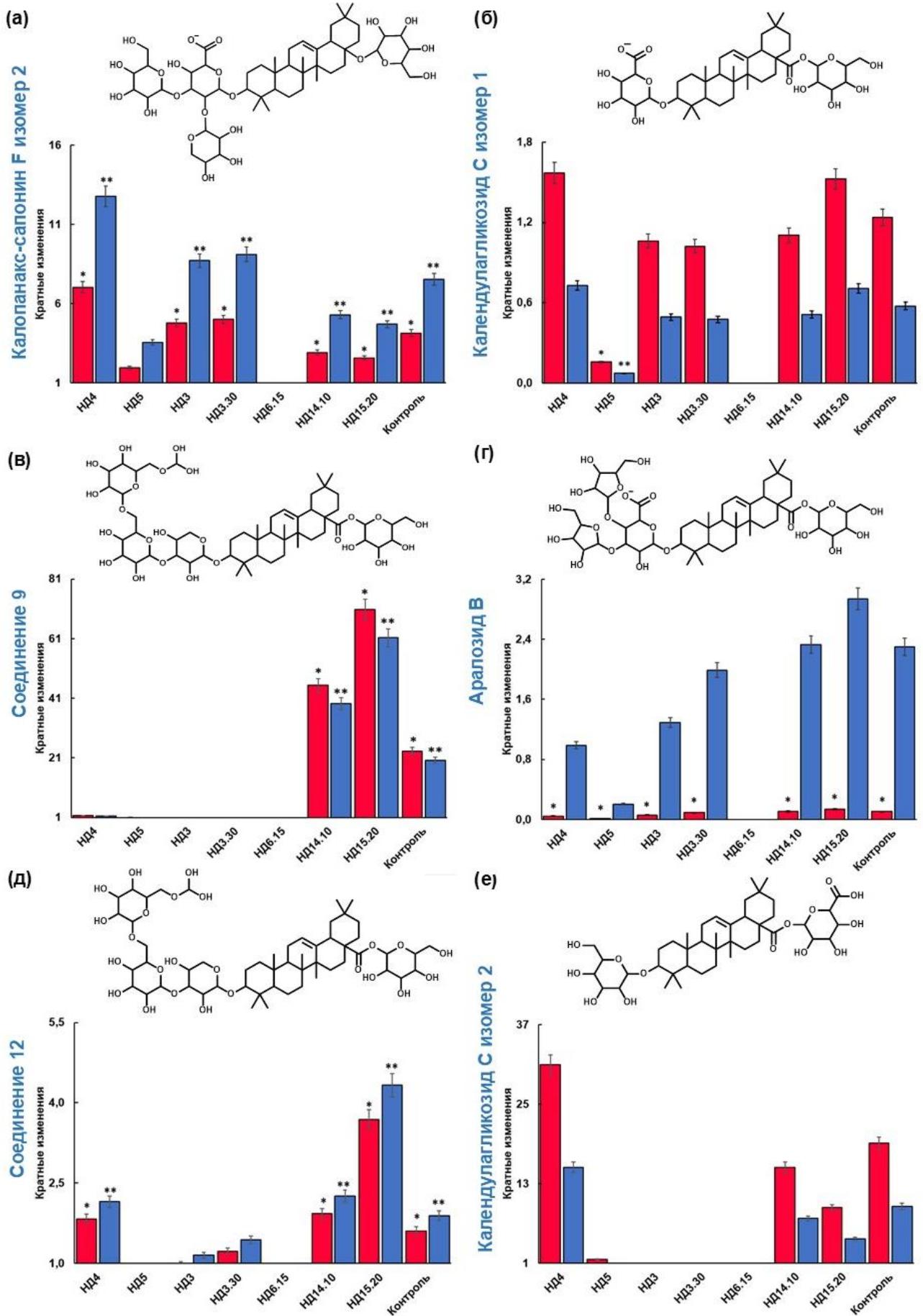


Рисунок 13 – Типичные хроматограммы NADES извлечений

(НД3 – хлорид холина – молочная кислота 1:3, НД4 – хлорид холина – яблочная кислота 1:1). Нумерация соединений указана в таблице 13. [125]

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 *A. маньчжурской* (рис. 14). Кратность изменения, превышающая единицу, указывала на лучшее извлечение, полученное с NADES.



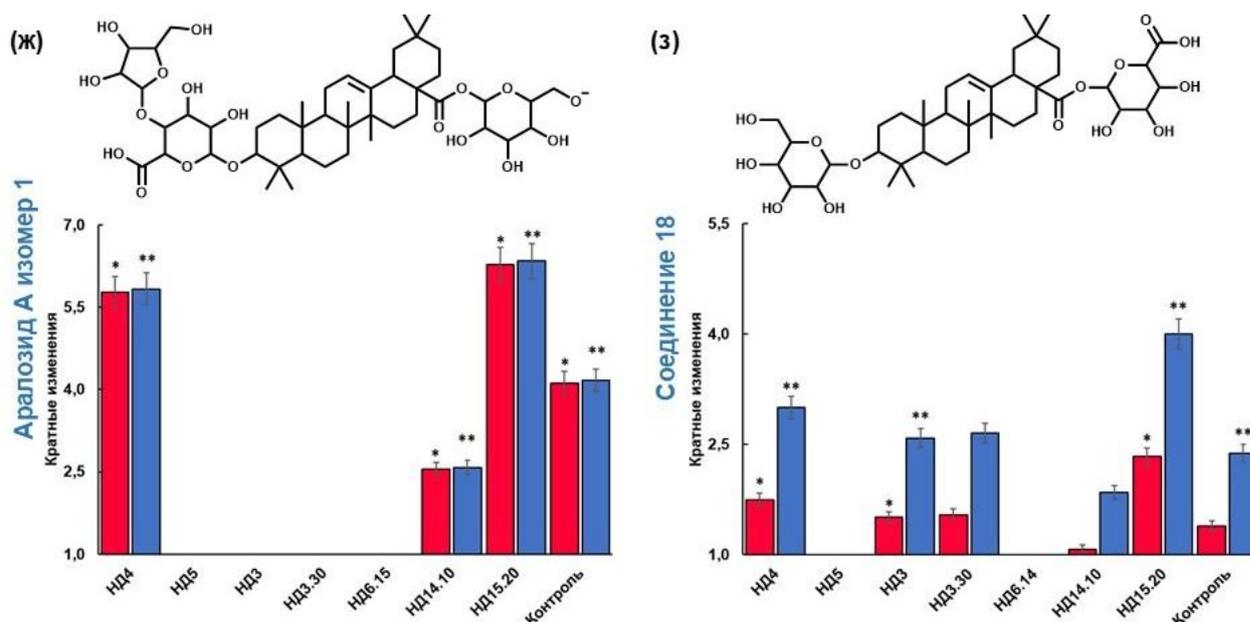


Рисунок 14 - Структуры и относительная степень извлечения соединений **6** (а), **7** (б), **9** (в), **10** (г), **12** (д), **13** (е), **14** (ж) и **18** (з), выраженная в виде кратных изменений по сравнению с теми, которые наблюдаются в водных (красные) и спиртовых (синие) извлечениях. Нумерация соединений указана в таблице 13. *—статистически значимое значение по сравнению с водным извлечением ($p \leq 0,05$); **—статистически значимое значение по сравнению со спиртовым извлечением ($p \leq 0,05$) [125]

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. Наибольшее относительное содержание соединений **6**, **7**, **13**, **19** было обнаружено при применении растворителя холина хлорида и яблочной кислоты (HD4) в соотношении 1:1. А наибольшее относительное содержание соединений **8**, **9**, **10**, **12**, **14**, **16**, **18** было обнаружено при применении растворителя сорбита и яблочной кислоты (HD15.20) в соотношении 1:2 с добавлением 20% воды. В частности, относительная степень извлечения сапонины **6** при использовании NADES была выше, чем при использовании воды и спирта. При этом относительное содержание соединения **6** в составе HD4 было в 13 раз выше, чем в спирте, и в 8 раз выше,

чем в воде (рис. 14 а). Относительное содержание сапонина **7** (рис. 14 б) было выше в 1,7 раз в извлечении с NADES, чем с водой, тогда как по сравнению со спиртом относительное содержание было ниже. Относительное содержание сапонина **9** с использованием растворителя НД15.20 было в 70 раз выше, чем в водном извлечении, и в 61 раз выше, чем в спиртовом извлечении (рис. 14 в). Природные глубокие эвтектические растворители оказались более эффективными, чем спирт, для экстракции соединения **10**. Эту тенденцию наблюдали для извлечений с растворителем НД15.20 (рис. 14 г). Относительное содержание соединения **12** было выше в NADES извлечениях. Наиболее четко это можно увидеть для извлечений с растворителем НД15.20 (рис. 14 д). С другой стороны, относительное содержание тритерпенового сапонина **13** было самым высоким при использовании растворителя НД4 (рис. 14 е). Относительная степень извлечения для соединения **14** была больше в растворителе НД15.20 по сравнению с водой и спиртом (рис. 14 ж). То же самое можно наблюдать и для соединения **18** (рис. 14 з).

Экстракционная активность NADES в отношении отдельных тритерпеновых сапонинов существенно различался (рис. 14), что во многом можно объяснить различиями в структуре аналитов. Более того, на это явление также влияет изомерия. Например, закономерности извлечения двух изомеров календулагликозида С (рис. 14 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 [133,134].

В целом, эффективность NADES при экстракции тритерпеновых сапонинов из корней аралии снижалась в следующем порядке: НД15.20 (сорбит – яблочная кислота 1:2 + 20% воды) > НД4 (холина хлорид – яблочная кислота 1:1) > НД14.10 (сорбит – яблочная кислота + 10% воды) > НД3.30

(холина хлорид – молочная кислота + 30% воды). Вероятно, наблюдаемое высокое извлечение тритерпеновых сапонинов в NADES можно объяснить близкими значениями pH (2,26 для НД4 и 3,84 для НД3.30) к рКа олеаноловой кислоты (4,74) – агликона всех обнаруженных тритерпеновых сапонинов.

Литературные данные свидетельствуют о том, что NADES (холина хлорид – молочная кислота 1:1) был эффективен для экстракции тритерпенового сапонины (глицирризиновой кислоты) из *Glycyrrhiza glabra* [98,99]. Р. S. Suresh с соавторами показали, что этот природный глубокий эвтектический растворитель также эффективен для экстракции стероидных сапонинов из *Trillium govanianum* [104]. NADES (холина хлорид – молочная кислота 1:2) оказался эффективен при экстракции сапонинов из *Eleuterococcus centicosus* [7]. Аналогичные данные для NADES на основе молочной кислоты были получены G. Liu и соавторами для стероидных сапонинов из *Polygonatum cyrtonema* [105]. Увеличение относительного содержания воды в природных глубоких эвтектических растворителях приводит к лучшей сольватации полярных аналитов и, следовательно, к повышению экстракционной способности. Добавление воды снижает вязкость. Это способствует диффузии, водородные связи между компонентами при этом ослабляются [5]. Примечательно, что для экстракции калопанакс-сапонины F изомера 2 (**6**), календулагликозида С изомера 1 (**7**), календулагликозида С изомера 2 (**13**) и олеаноловая кислота 3-О-гексуронид-1-3-пентафуранозида (**19**) наиболее подходящим растворителем был НД4 (холина хлорид – яблочная кислота 1:1) (рис. 14). Данный растворитель также был эффективен для экстракции гинзенозида Rb1 из стеблей женьшеня [101] и стероидных сапонинов из *Dioscorea nipponica* [103]. Другие исследователи отметили эффективность смеси ацетилхолина хлорида с яблочной кислотой и водой (в молярном соотношении 1:2:2) для экстракции тритерпеновых сапонинов – мадекассозида и азиатикозида из *Centella asiatica* [97].

Важно отметить, что применение NADES не только дает возможность повысить эффективность экстракции, но также обеспечивает стабильность получаемых извлечений [11]. 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 сапонинами [3,4]. Тогда как водные извлечения склонны к микробной контаминации и поэтому имеют ограниченный срок хранения [66,91,125,135].

ВЫВОДЫ ГЛАВЫ 4

По результатам целевого метаболомного профилирования было идентифицировано двадцать тритерпеновых сапонинов (производных олеаноловой кислоты) в корнях аралии маньчжурской. Соединения **1, 3, 4–7, 13, 15** и **20** были идентифицированы в корнях впервые. Кроме того, семь природных глубоких эвтектических растворителей на кислотной основе были успешно применены для экстракции тритерпеновых сапонинов из корней аралии маньчжурской в первый раз. Все NADES были способны экстрагировать тритерпеновые сапонины. 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). Примечательно, что NADES оказались более эффективными растворителями, чем вода и спирт для экстракции одиннадцати тритерпеновых сапонинов. Относительные содержания соединений **6–10, 12–14, 16, 18** и **19** были выше в NADES извлечениях по сравнению с водными и спиртовыми. Результаты данного эксперимента доказывают перспективу замены воды и спирта нетоксичными «зелеными» природными глубокими эвтектическими растворителями для экстракции тритерпеновых сапонинов из корней аралии маньчжурской.

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

Изучение влияния условий экстракции, а также их выбор являются важнейшими этапами для разработки технологии получения субстанций из лекарственного растительного сырья с наибольшим выходом БАВ. Для оценки качественных и количественных характеристик получаемых извлечений необходимо было подобрать наиболее чувствительный метод 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, и в предыдущей главе мы показали способность NADES извлекать тритерпеновые сапонины, для оценки эффективности экстракции корней аралии маньчжурской мы использовали суммарное содержание тритерпеновых сапонинов. Согласно ФС.2.5.0058.18 «*Аралии маньчжурской корни*» для стандартизации используется метод неводного титрования с потенциометрическим детектированием. Профессором В.А. Куркиным для стандартизации корней аралии маньчжурской, настойки и сиропа аралии была предложена методика спектрофотометрического определения суммы сапонинов в пересчете на «Сапарал» (сумму аммонийных солей аралозидов А, В и С) после реакции с концентрированной серной кислотой [136,137]. В настоящее время «Сапарал» не выпускается российской промышленностью и препарат не входит в государственный реестр лекарственных средств (<https://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx>, дата доступа: 17.10.2024 г.). Проведение ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием является более информативным для изучения спектра извлекаемых соединений, такой метод является дорогостоящим, достаточно трудоемким и не рационален для рутинного анализа.

В качестве альтернативного мы разработали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием. Суммарное содержание тритерпеновых сапонинов оценивали в пересчете на аралозид А. Подбор условий анализа был основан на анализе литературных данных [138]. Хроматографирование проводили с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония), оснащенный 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, при скорости подвижной фазы 0,8 мл/мин и температуре колонки 30 °С (таблица 15).

Таблица 15. Условия градиентного режима

Состав подвижной фазы В (%)	Время, мин
5	0
20	10
28	25
33	35
38	45
46	55
60	60
75	68
5	70
5	75

Обработку данных проводили с использованием программного обеспечения LabSolution (Shimadzu Corporation, Япония), Origin 2022 (OriginLab Corporation, США).

5,00 г (точная навеска) NADES извлечения смешивали с 4,60 мл 96,4% спирта этилового, затем центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 мин. Отбирали надосадочную жидкость, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и 10 мкл дозировали в ВЭЖХ-систему. Длина волны детектирования 210 нм.

Расчет содержания суммы сапонинов (x) в пересчете на аралозид А (в мг/г) проводился по нижеприведенной формуле (2):

$$x = \frac{m_{\Sigma} \cdot K}{m_{\text{извлечения}}} \quad (2)$$

где x – содержание суммы сапонинов в пересчете на аралозид А в получаемом извлечении, мг/г;

m_{Σ} – масса сапонинов в извлечении, мг;

$m_{\text{экстракта}}$ – масса полученного извлечения, г;

K – коэффициент нормализации, рассчитываемый с учетом разведения

5.1. Валидация методики качественного и количественного анализа тритерпеновых сапонинов

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.

5.1.1. Специфичность методики

При количественном анализе необходимо оценивать специфичность в отношении определяемого компонента, то есть следует подтвердить, что на результат анализа не влияет присутствие сопутствующих компонентов, возможных примесей, вспомогательных веществ, остаточных растворителей и др.

Для оценки специфичности необходимо проверить соответствие времени удерживания аралозида А в растворе СО и полученных извлечениях, а также наличие/отсутствие пиков в области нахождения целевого аналита при сравнении хроматограмм растворов стандартного образца, растворителей, применяющихся при анализе и экстракции (спирт этиловый 96,4 %, составы НД4 и НД14).

Методика проведения анализа СО аралозида А:

20,00 мг (точная навеска) стандартного образца аралозида А отвешивают и помещают в мерную колбу на 25,00 мл, растворяют в 5,00 мл 96,4 % спирта этилового, доводят до метки растворителем и перемешивают.

Типичные хроматограммы СО аралозида А и НД4, НД14 представлены на рис. 15, NADES извлечений и СО аралозида А – на рис. 16.

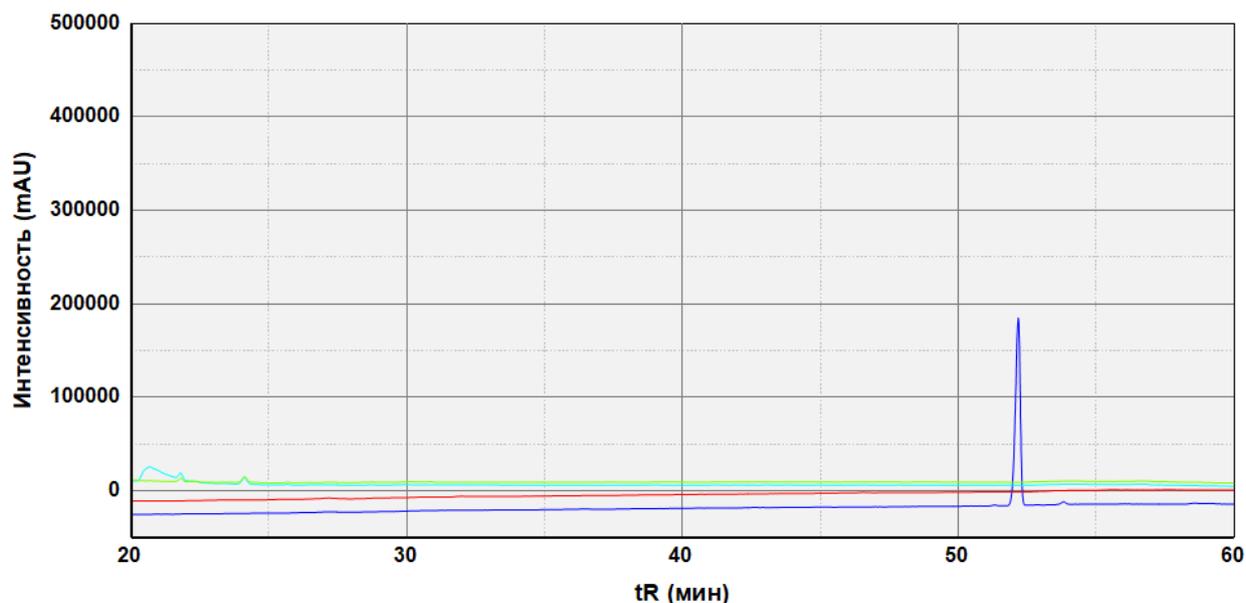


Рисунок 15 – Хроматограммы растворителей и СО аралозида А (голубая линия – НД 4 (холина хлорид и яблочная кислота (1:1), зеленая линия – НД14 (сорбит и яблочная кислота (1:1), красная линия – этиловый спирт 96,4%, синяя линия – СО аралозида А)

Стандартный образец аралозида А имеет время удерживания 52,2 мин. На хроматограммах растворителей не обнаружены пики в области нахождения целевого анализа.

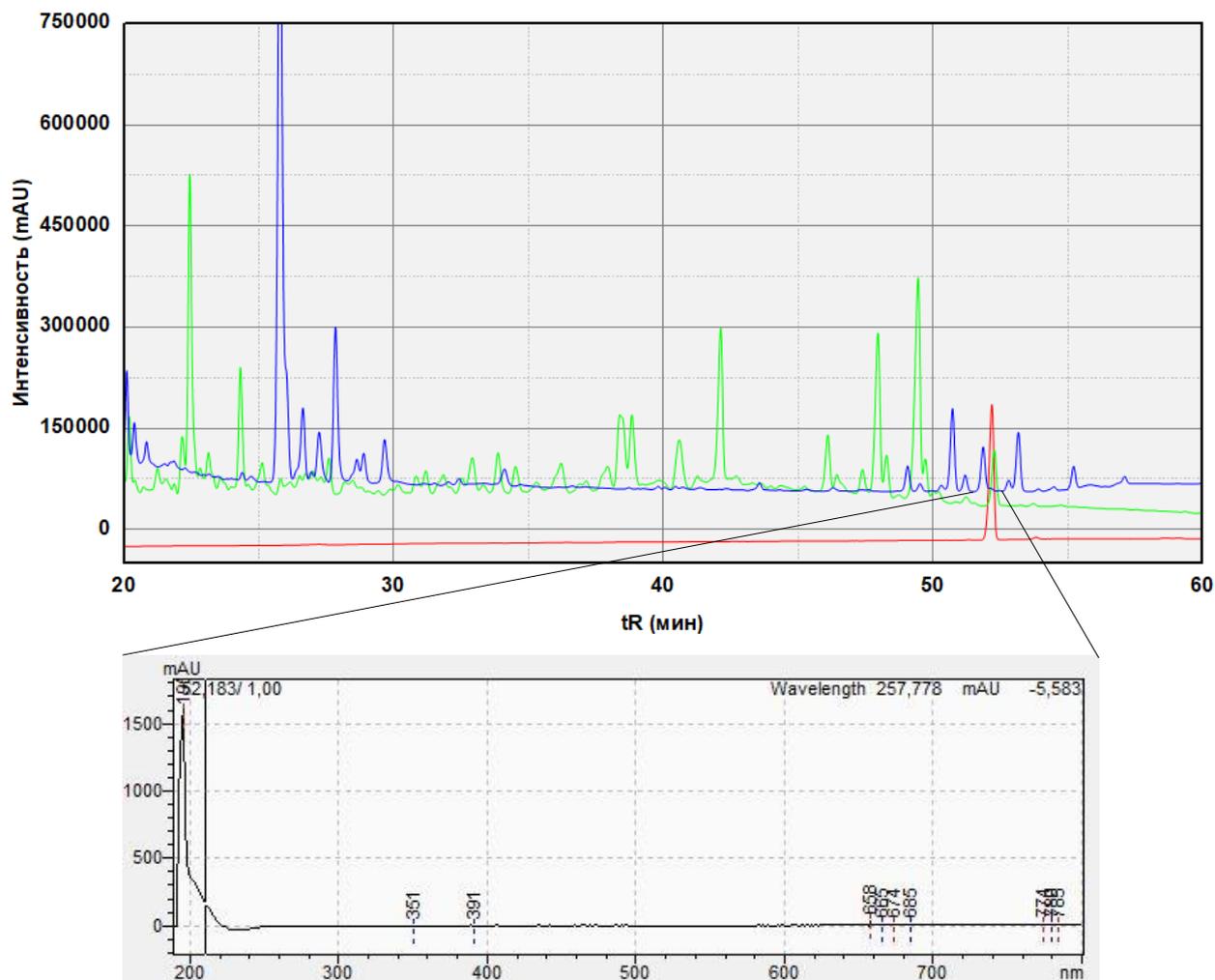


Рисунок 16 – Типичные хроматограммы с растворителем НД4 (холина хлорид и яблочная кислота (1:1) (зеленая линия), НД14 (сорбит и яблочная кислота (1:1) (синяя линия) и СО аралозида А (красная линия) и типичный УФ-спектр аралозида А

На рис. 16 на типичных хроматограммах NADES извлечений присутствуют пики, соответствующие аралозиду А. Время удерживания аралозида А на хроматограммах СО и NADES извлечения совпадают. УФ-спектры аралозида А в СО в извлечениях с растворителями НД4 и НД14 одинаковые.

5.1.2. Линейность

Зависимость концентрации СО аралозида А должна быть пропорциональна площади/высоте пиков в образце в пределах аналитической методики, которую экспериментально проверяют измерением аналитических

сигналов 5 и более проб с различными концентрациями (таблица 16). Критерием приемлемости является коэффициент корреляции r , который должен быть $\geq 0,99$.

Для разведения стандартного образца используют аликвоты (0,10; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60 мл), помещают в мерную колбу на 10,00 мл, растворяют в этиловом спирте, доводят до метки, перемешивают. Переносят в вials и хроматографируют.

Таблица 16. Экспериментальные данные оценки линейности методики

№	Объем аликвоты раствора СО аралозида А, мл	Концентрация СО аралозида А, мг/мл	Площадь пика, мAU*сек	Высота пика, мAU
1	0,1	0,008	22 493	1 937
2	0,3	0,024	70 910	6 020
3	0,4	0,032	93 958	7 890
4	0,5	0,040	120 544	10 067
5	0,6	0,048	142 556	11 901

Линейная зависимость представлена на рис. 17. Коэффициент корреляции r составляет 0,9998, что соответствует критерию приемлемости.

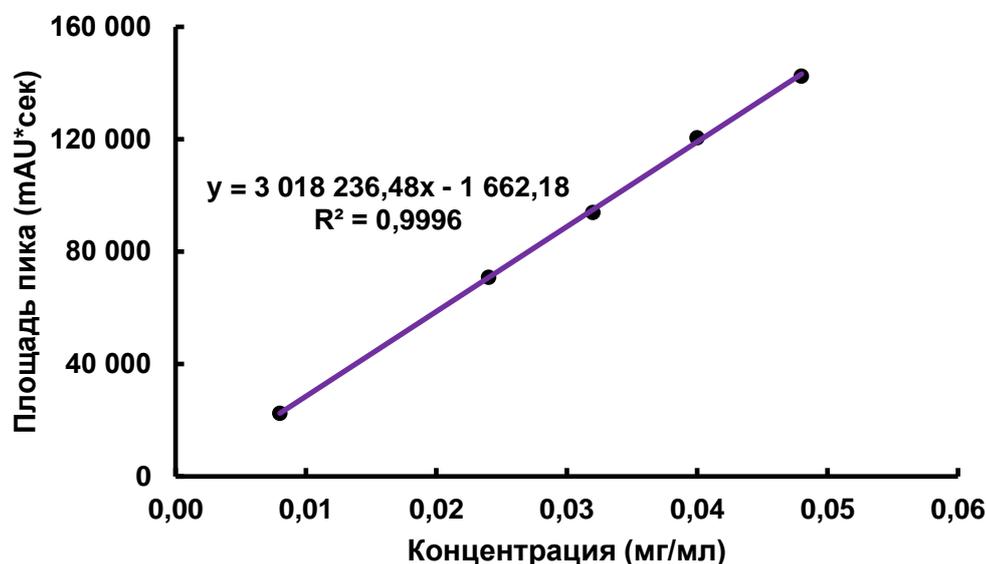


Рисунок 17 – Градуировочный график стандартного образца аралозида А

В выбранном диапазоне концентраций зависимость является линейной, аналитическая область установлена по диапазону экспериментальных данных.

Предел количественного обнаружения – 0,004 мг/мл.

5.1.3. Прецизионность

Прецизионность характеризуется степенью разброса результатов между сериями измерений, проведенных на множестве проб в условиях методики. Прецизионность оценивалась по параметру повторяемость (сходимость).

Для валидации методики анализа извлечений было проведено количественное определение 6 образцов. Условия и результаты анализа приведены в таблице 17.

Таблица 17. Результаты анализа проверки прецизионности методики

№	Площадь пика аралозид А в образце, mAU*сек	Количество аралозид А в образце, мг	Среднее значение	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение), %	Доверительный интервал
1	124942	0,0419	0,0422	0,0007	1,5429	0,0017
2	123987	0,0416				
3	128325	0,0431				
4	126001	0,0423				
5	123767	0,0416				
6	127987	0,0430				

Критерием приемлемости является значение коэффициента вариации до 2%. По результатам анализа получено значение 1,54%, что доказывает, что методика соответствует критерию приемлемости.

5.1.4. Правильность

Правильность аналитической методики выражает степень совпадения между истинным значением или принятым в качестве референтного значения и найденным значением. Необходимо оценивать на испытуемых растворах, к которым прибавлены известные количества стандартного образца. Если процент открываемости составляет 97-103%, методика анализа является правильной.

Для этого были приготовлены растворы извлечений с добавлением известного количества стандартного образца аралозид А (таблица 18) и проведен ВЭЖХ анализ.

Таблица 18. Результаты анализа проверки правильности методики

№	Рассчитанное содержание аралозида А в извлечении, мг	Количество СО аралозида А, мг	Ожидаемое содержание, мг	Экспериментальное содержание, мг	Среднее значение	Открываемость (%)
1	0,0390	0,0080	0,0470	0,0463	0,0464	98,6
				0,0459		
				0,0469		
2	0,0420	0,0080	0,0500	0,0489	0,0490	98,0
				0,0514		
				0,0467		
3	0,0490	0,0080	0,0570	0,0562	0,0576	101,1
				0,0580		
				0,0588		

По результатам проверки правильности методики значения открываемости составляют 98,0 – 101,1%. Следовательно, правильность методики подтверждена.

Таким образом, доказана способность методики точно и селективно определять качественные и количественные характеристики аралозида А в испытуемых извлечениях в присутствии сопутствующих веществ.

В связи с тем, что использование в рутинном анализе дорогостоящих стандартов всех аралозидов не рационально, впоследствии сумму сапонинов корней аралии определяли по сумме площадей пиков соединений со временем удерживания от 48,0 до 55,0 мин. Подобный подход является достаточно распространенным в практике анализа и стандартизации фитопрепаратов [139]. Пики соединений, которые принадлежат к классу сапонинов были выбраны на основании соответствия УФ-спектров соединений и УФ-спектра аралозида А (рис. 16). Помимо этого, аналогичные времена удерживания пиков были выбраны в соответствии с временами удерживания, описанными в статье Н. Li и соавторов для оценки количественного содержания сапонинов в спиртовых извлечениях *Aralia taibaiensis* [138].

5.2. Планирование эксперимента по интенсификации экстракции тритерпеновых сапонинов из корней Аралии маньчжурской

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 частности, этот метод был применен для экстракции фенольных соединений и терпеноидов [140], протеинов и полисахаридов [141], флавоноидов [142] и др. УЗЭ повышала выход сапонинов из *Женьшеня ложного* [106], *Элеутерококка колючего* [7], *Солодки голой* [98]. В ряде случаев УЗЭ способствует увеличению выхода целевых биоактивных компонентов, что делает его привлекательным методом для экстракции с применением NADES [140-142]. Однако, закономерности экстракции тритерпеновых сапонинов (ТС) из корней аралии не изучены.

В соответствии с результатами эксперимента, описанного в главе 4, для извлечения тритерпеновых сапонинов аралии применяли растворители НД4 и НД14 (таблица 11). Мацерацию проводили на магнитной мешалке с подогревом LMS-2003D (Daihan Labtech, Южная Корея). Ультразвуковую экстракцию проводили с помощью ультразвуковой ванны Сапфир - 1,3 (2), частота 35 кГц ТТЦ (РМД) (НПП Сапфир, Россия). Соотношение сырье:экстрагент составляло 1:25 (по массе). Рассчитанное количество сырья аралии (точная навеска) измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. В колбу отвешивали необходимое количество (точная навеска) растворителя, смешивали с сырьем. Далее осуществляли мацерацию или обработку ультразвуком.

Для многофакторного эксперимента по изучению влияния условий экстракции на выход ТС из корней аралии выбрали качественные факторы:

тип NADES (фактор А на двух уровнях: a1 – НД4 и a2 – НД14), метод экстракции (фактор В на двух уровнях: b1 - мацерация и b2 – УЗЭ). Количественными факторами были температура экстракции (фактор С на двух уровнях: c1 - 45 °С и c2 - 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 [142].

5.3. Результаты дисперсионного анализа для интерпретации процесса экстракции тритерпеновых сапонинов

Для оценки возможных взаимодействий между компонентами растворителей, структурных изменений, а также подтверждения образования водородных связей между акцептором и донором использовалась ИК-спектметрия.

Типичные ИК-спектры исходных компонентов и образовавшихся NADES на их основе представлены на рис. 18 и 19.

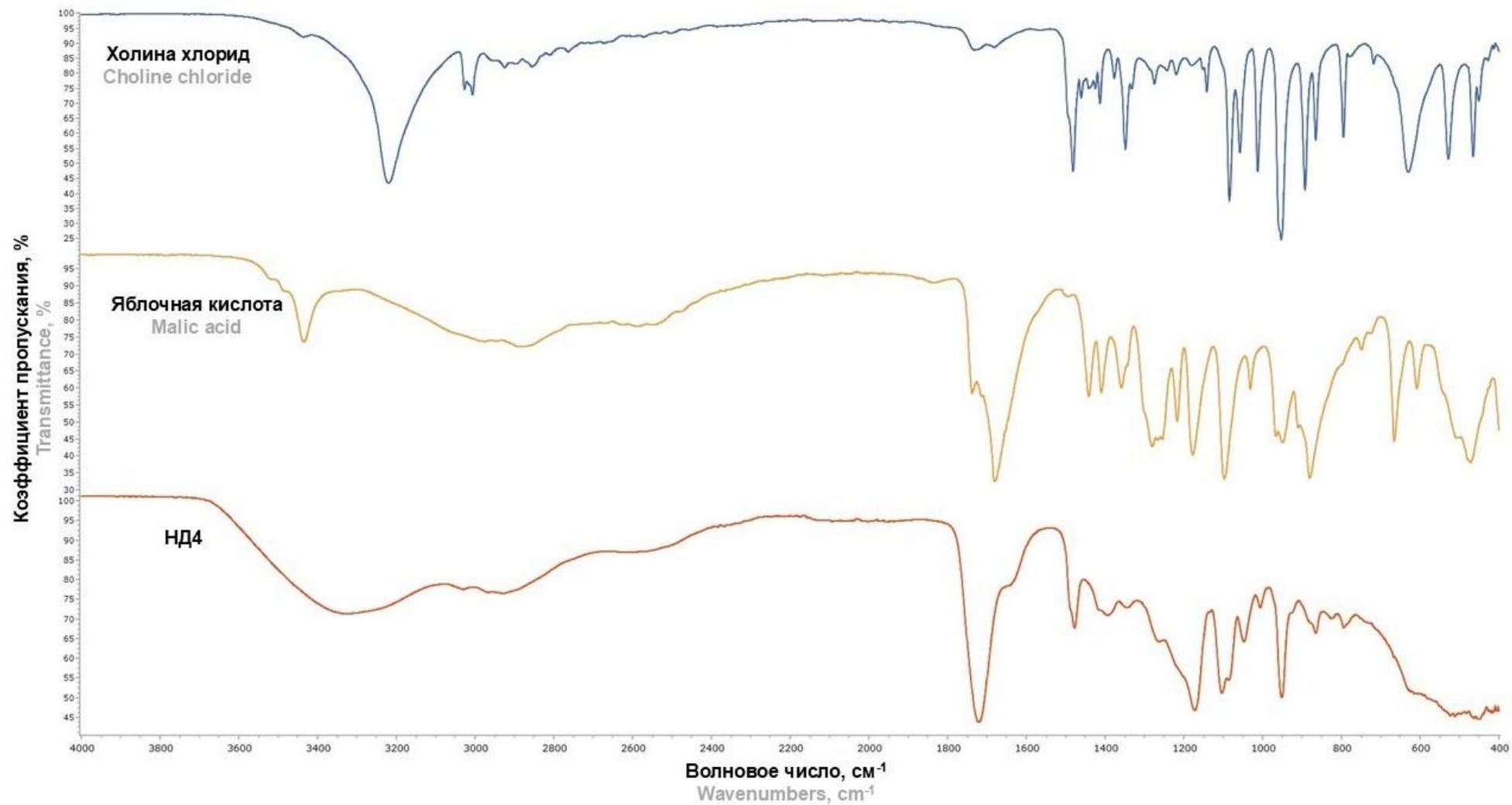


Рисунок 18 – Типичные ИК-спектры холина хлорида, яблочной кислоты и NADES при молярном соотношении 1:1 [142]

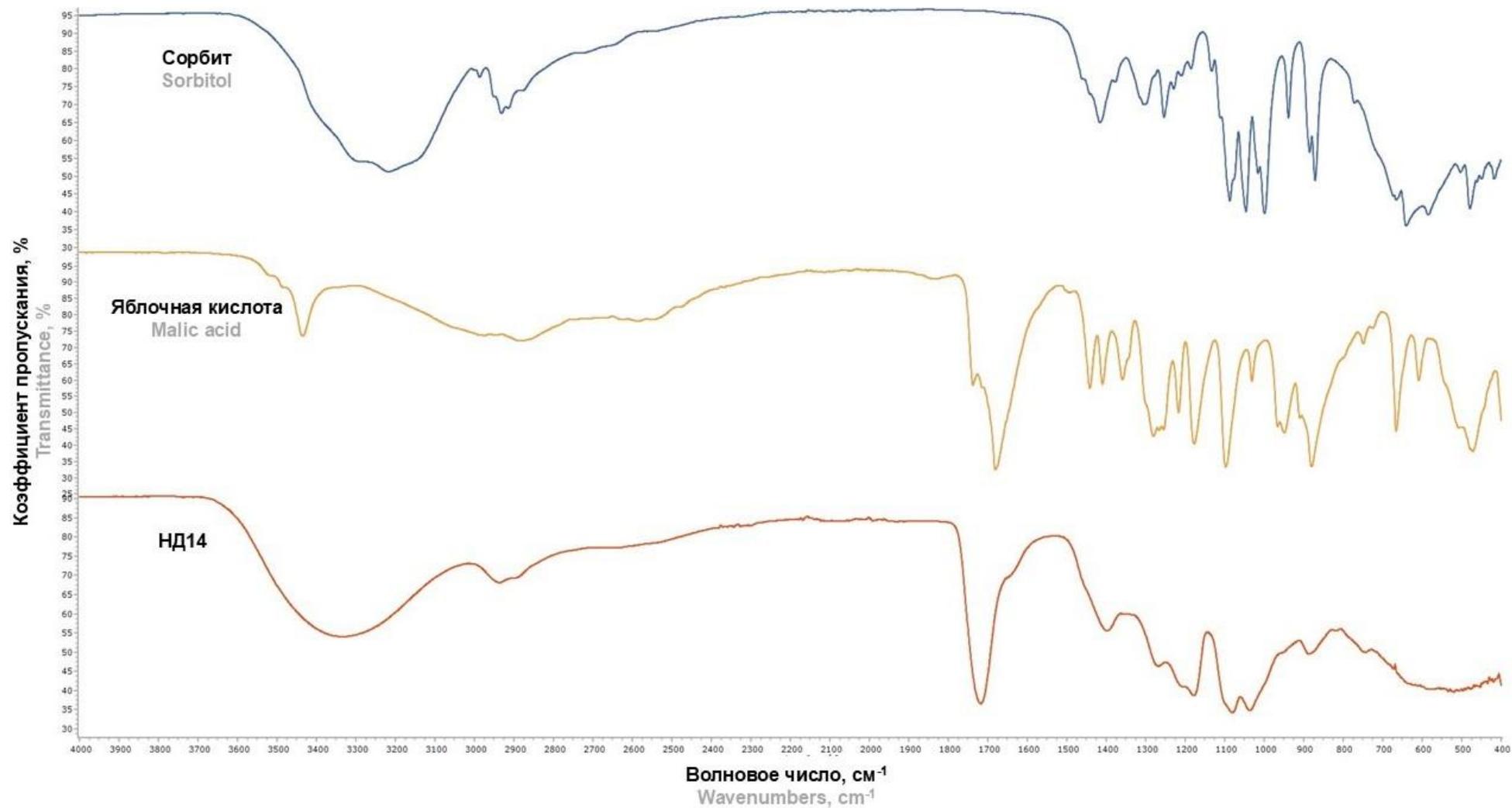


Рисунок 19 – Типичные ИК-спектры сорбита, яблочной кислоты и NADES при молярном соотношении 1:1 [142]

Сравнивая спектры NADES со спектрами исходных компонентов, можно отметить, что спектр NADES представляет собой перекрытие двух других спектров с небольшими различиями. Примечательно, что в спектрах растворителей сохраняются полосы, характерные для структурных фрагментов исходных компонентов. В области 3000-3500 см^{-1} можно заметить расширение полос поглощения по сравнению с исходными компонентами. На спектрах NADES появляется широкая полоса при 3329 см^{-1} (рис. 18), 3390 см^{-1} (рис. 19). Данная полоса соответствует растяжению валентных плоскостных колебаний $-\text{OH}$ группы. Это является подтверждением образования водородных связей. Полоса в диапазоне 2700-2800 см^{-1} свидетельствует о валентных плоскостных колебаниях $-\text{OH}$ карбоксильной группы (кислоты). Пик около 1700 см^{-1} соответствует валентным колебаниям $\text{C}=\text{O}$. Сигналы в области 1000–1300 см^{-1} можно отнести к валентным колебаниям $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и деформационным колебаниям $\text{C}-\text{O}-\text{H}$. Образование водородной связи приводит к изменениям в структурах молекул, благодаря которым в области «отпечатков пальцев» происходит смещение и уширение пиков, что является подтверждением межмолекулярной связи между компонентами, а не образования нового соединения [142].

В связи с тем, что вязкость растворителя оказывает влияние на массоперенос биологически активных веществ из растительной матрицы, необходимо было понять, каким образом вязкость изменяется в зависимости от температуры (рис. 20). Для эвтектических растворителей НД4 и НД14 измеряли динамическую вязкость при различной температуре.

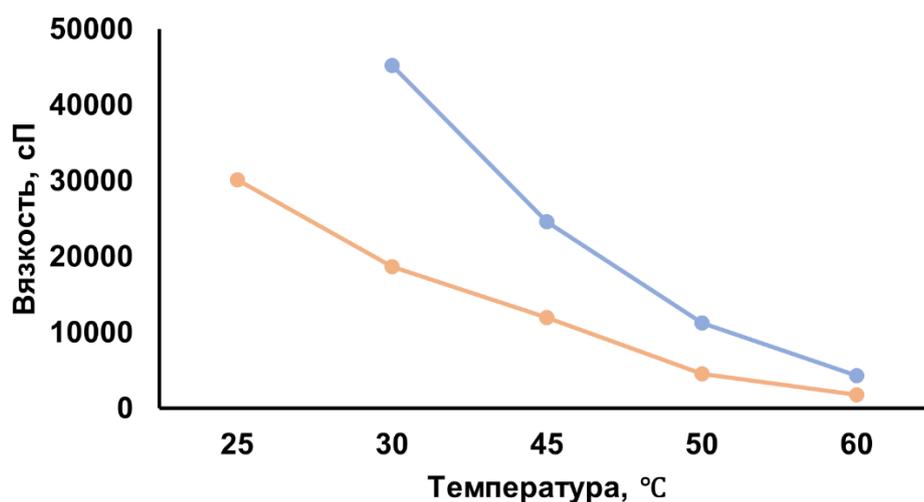


Рисунок 20 – Значения вязкости NADES (синяя линия – НД14, оранжевая линия – НД4) в зависимости от температуры

Вязкость при комнатной температуре достаточно высокая и снижается при увеличении температуры. Учитывая это, в процессе экстракции при увеличении температуры вязкость растворителя снижается, что способствует повышению диффузии биологически активных веществ в растворитель.

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 19).

Таблица 19. Дисперсионный анализ экспериментальных данных по экстрагированию ТС в пересчете на аралозид А в NADES извлечениях [142]

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 C	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		

Визуальная интерпретация данных приведена на рис. 21.

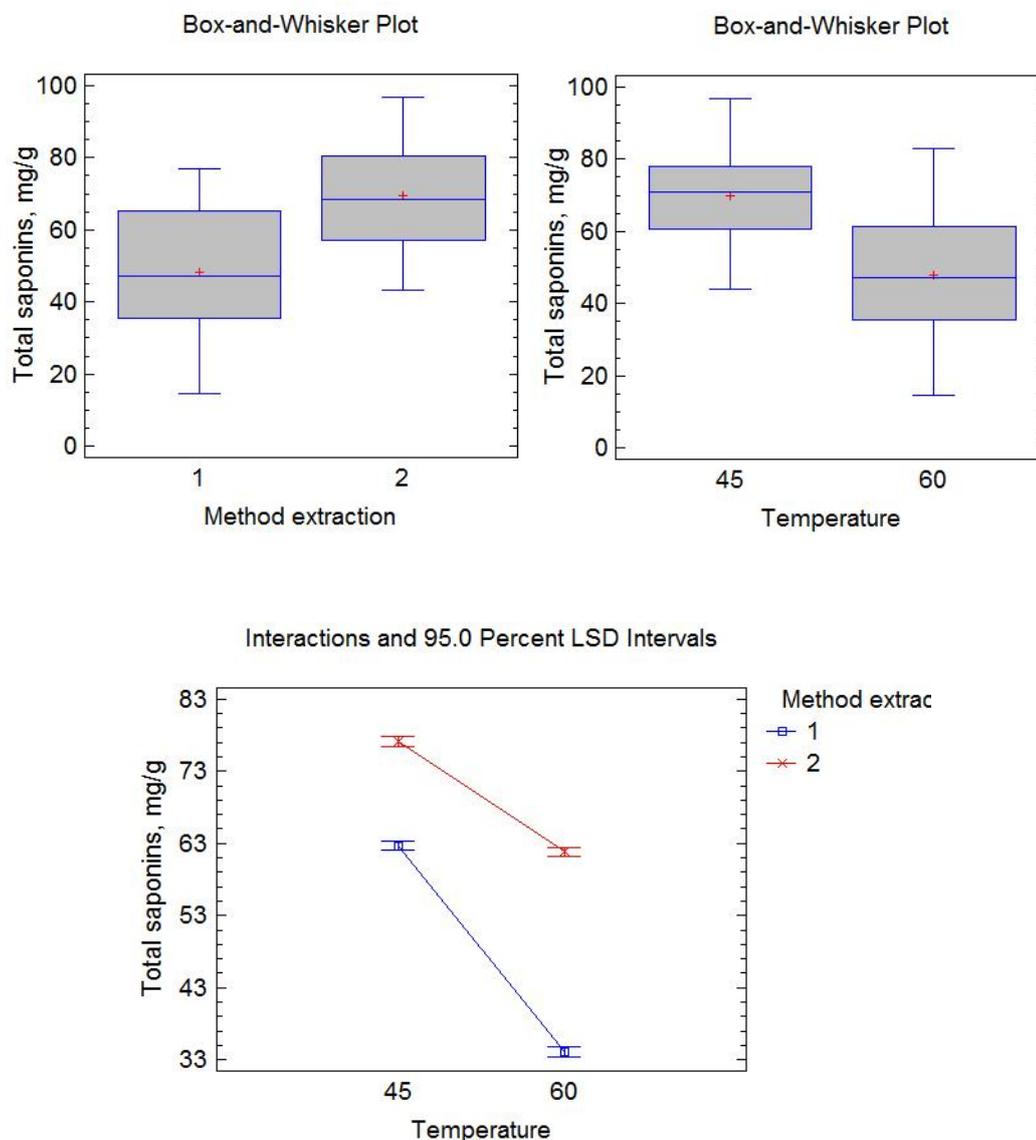


Рисунок 21 – Средние значения выходного параметра и 95%-е доверительные интервалы для двух уровней факторов B и C и их совместного сочетания [142]

Среди контролируемых факторов большую и значимую степень влияния на экстракцию ТС имеет фактор B – метод экстракции (30,8%) и фактор C – температура экстракции (33,3%), а влияние фактора A – тип NADES – оказалось малым (1,1%), но значимым ($p=0,0033 < 0,05$) (таблица 19, рис. 21).

Известно, что некоторые тритерпеновые сапонины могут быть термически неустойчивы [144]. 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. [145]. Увеличение температуры экстракции до 60 °С способствовало некоторому уменьшению выхода ТС (рис. 21), что, вероятно, связано с увеличением скорости деструкции молекул сапонинов.

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 [146], флавоноидов и тритерпенов [147]. Для повышения выхода и сохранности БАВ достаточно кратковременного воздействия ультразвуковых волн [148,149].

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. 22 и 23.

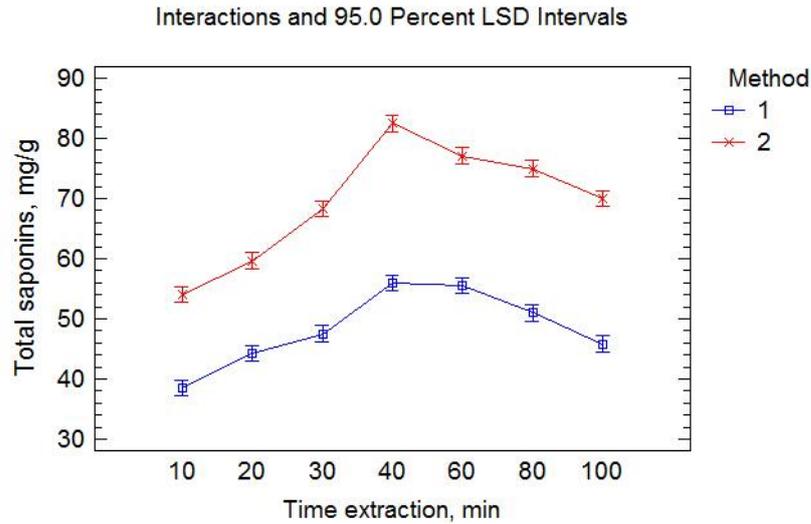


Рисунок 22 – Содержание тритерпеновых сапонинов (мг/г) в зависимости от времени при мацерации (1), при ультразвуковом воздействии (2) [142]

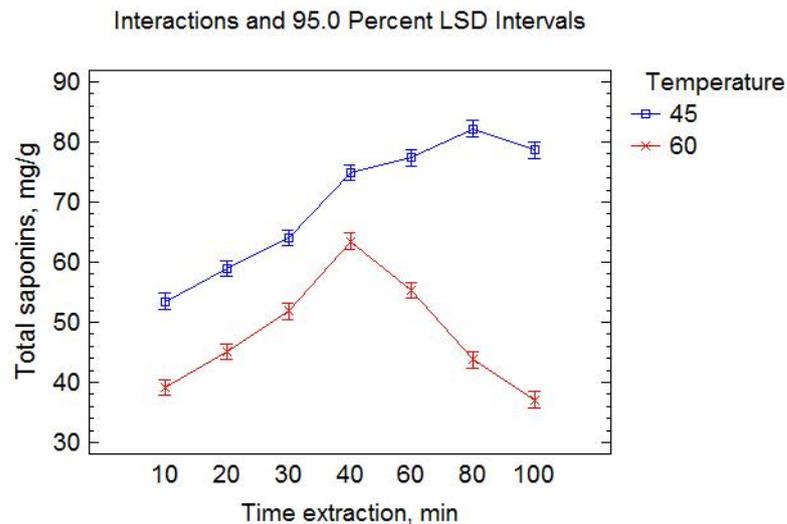


Рисунок 23 – Содержание тритерпеновых сапонинов (мг/г) в зависимости от времени ультразвуковой обработки при температуре 45 °C и 60 °C [142]

Результаты, представленные на рис. 22 и 23 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. Вероятно, это произошло из-за разложения некоторых тритерпеновых сапонинов, что также наблюдалось в предыдущих исследованиях [150,152]. Необходимо отметить, что 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. Для сравнения, содержание ТС в настойке аралии промышленного производства составляло 28,9 мг/г [142].

ВЫВОДЫ ГЛАВЫ 5

Разработаны подходы к оценке качественного и количественного состава с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором. Сумму сапонинов корней аралии определяли по сумме площадей пиков соединений в пересчете на аралозид А. Валидация методики проведена по показателям: специфичность, линейность, аналитическая область, прецизионность, правильность.

Методом ИК-спектроскопии подтвердили образование NADES (НД4 и НД14) за счет образования водородных связей между компонентами растворителей. Была оценена вязкость составов природных глубоких эвтектических растворителей в зависимости от температуры.

Согласно данным 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.

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 данном 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.

6.1. Планирование эксперимента

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 и виброкавитационной обработки (рис. 24).

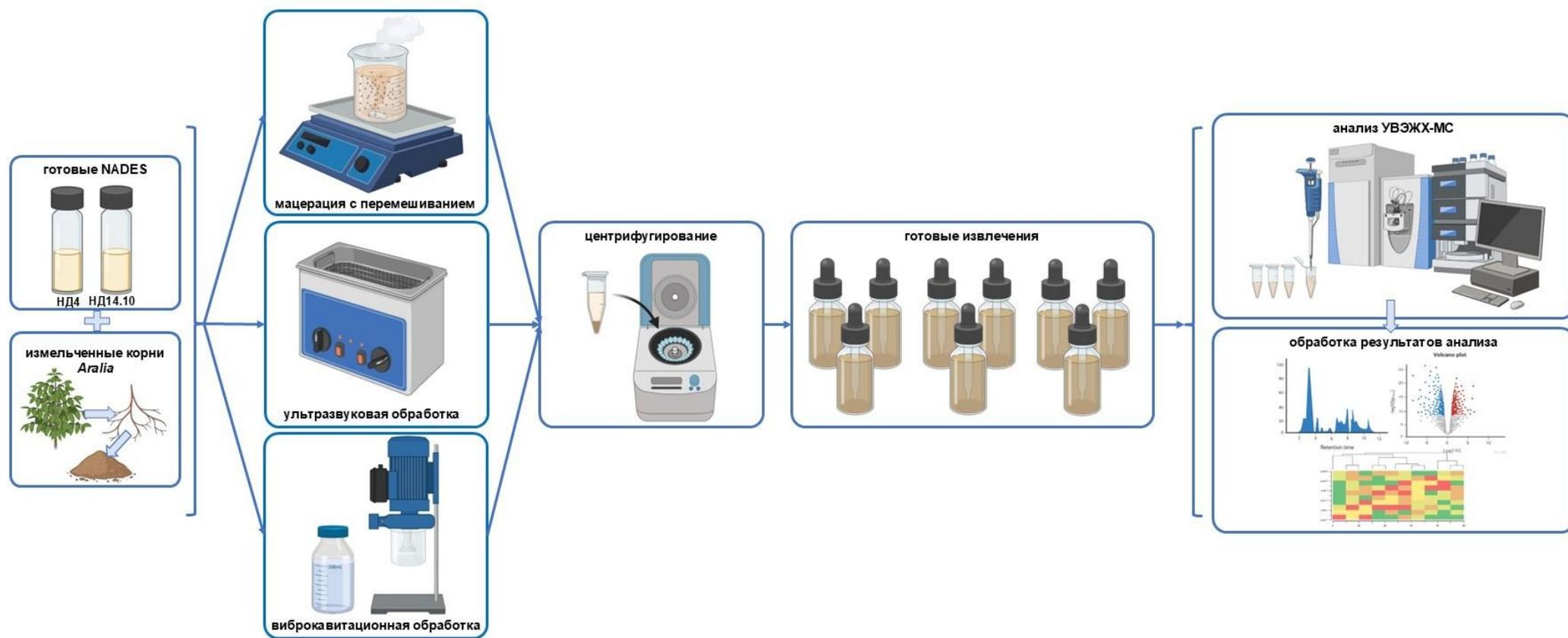


Рисунок 24 – Схема проведения эксперимента (создано с помощью <https://app.biorender.com/>)

Для мацерации измельченные корни аралии до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,3 мм, помещали в колбу, заливали растворителем. Колбу нагревали на магнитной мешалке при температуре 60 °С в течение 60 минут, скорость вращения магнитной мешалки – 300 об/мин. УЗЭ осуществляли с тем же сырьем, в колбе на ультразвуковой бане при температуре 40 °С в течение 45 минут с рабочей частотой 35 кГц. Для ВКЭ измельченные корни аралии загружали в стакан виброкавитационной установки, заливали растворителем (рис. 25). Экстракцию осуществляли при частоте 50 Гц в течение 5 минут. Соотношение сырье:экстрагент при всех методах было 1:40. Перед анализом извлечения с NADES растворяли в воде (в соотношении 2:3) и помещали в ультразвуковую баню на 15 мин (35 кГц), 200 мкл центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин (4°С). Надосадочную жидкость (180 мкл) анализировали с помощью УВЭЖХ-МС, как описано в разделе 2.4.3 (нецелевой анализ).

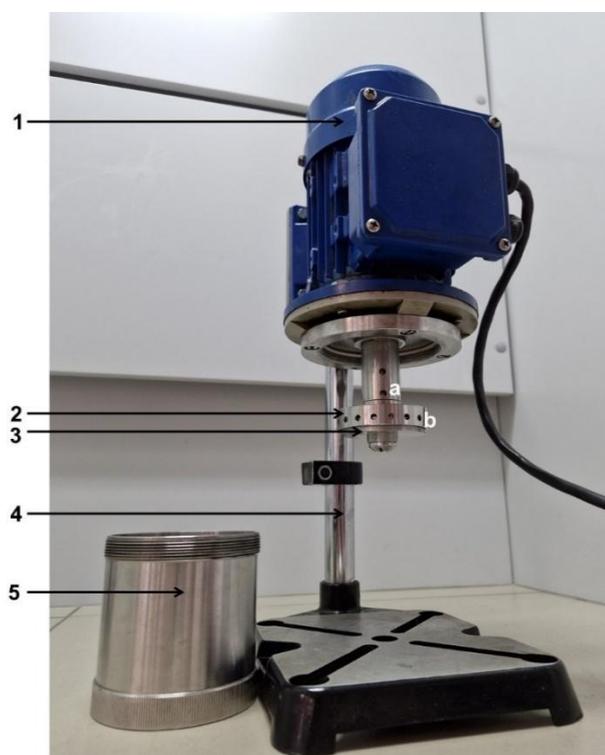


Рисунок 25 – Фото виброкавитационного гомогенизатора (лабораторный образец аппарата, разработанный в СПбГТУ (ТИ)) [150]

Обработку хроматограмм осуществляли с помощью MSDial (версия 4.9, UC Davis, США). Соответствие выбранных параметров было подтверждено путем параллельного сравнения результатов кратных изменений отдельных пиков аралозидов А, В и С в программном обеспечении Xcalibur Software (версия 4.1, Thermo Scientific, США). Данные анализа метаболомики обрабатывали с помощью Metaboanalyst 5.0 Software (Wishart Research Group, Канада). Проводили анализ главных компонент (principal component analysis, PCA), иерархический кластерный анализ (hierarchical clustering analysis, HCA) с представлением результатов в виде тепловых карт. Volcano plot для визуализации был построен на основании сравнения по t-критерию (с поправкой на коэффициент ложного обнаружения (False Discovery Rate, FDR) с использованием критерия Бенджамини-Хохберга (Benjamini-Hochberg method) при $p \leq 0,05$ и заданном значении кратных изменений (fold changes, FC). 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 ниже, чем в средней пробе. Цифрами 1,2,3 на рисунках 27, 29-31, 33 обозначены три повторности эксперимента.

6.2. Результаты сравнения методов интенсификации процесса экстракции биологически активных веществ из Аралии

Чтобы исследовать вторичные метаболиты растения эффективным и всесторонним способом, был проведен анализ с помощью обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с тандемной масс спектрометрией в гибридном масс-анализаторе, основанном на комбинации электродинамической и орбитальной ионных ловушек как в режиме положительно, так и отрицательно заряженных квази-молекулярных ионов. Однако, интенсивности сигналов, наблюдаемые при анализе в режиме

положительной ионизации, были слабыми, поэтому дальнейшему анализу подвергались данные, полученные при негативной ионизации.

6.2.1. Сравнение методов экстракции при использовании NADES в качестве экстрагентов

На первом этапе сравнивались три метода экстракции (мацерация с перемешиванием, УЗЭ и ВКЭ), применяемые к каждому NADES индивидуально. Для этого был использован анализ главных компонент. Для извлечений, полученных с помощью растворителей НД4 и НД14.10, РСА-анализ 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 показывает четкое разделение между тремя различными методами экстракции (рис. 26 а, б). Как видно из первого графика оценки (рис. 26 а,б), распределение отдельных извлечений, полученных с растворителем НД4 с помощью ВКЭ и УЗЭ, относительно близкое, что может указывать на высокую воспроизводимость результатов. В то время как метод мацерации (рис. 26 а,б) показал самую высокую дисперсию (т.е. самую низкую воспроизводимость) при использовании НД14.10.

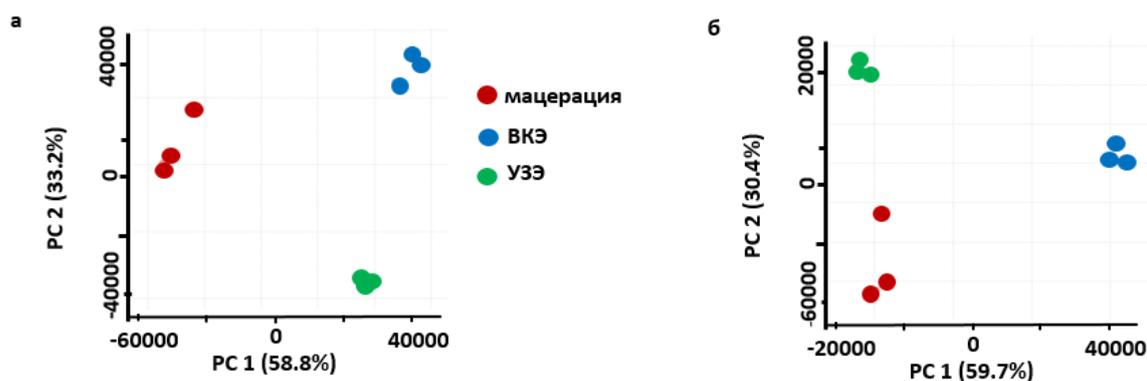


Рисунок 26 – Результаты анализа главных компонент (РСА) с графиками оценок, иллюстрирующими сравнение трех различных методов экстракции (мацерация, УЗЭ и ВКЭ) с точки зрения их эффективности, наблюдаемой с НД4 (хлорид холина/яблочная кислота) (а) и НД14.10 (сорбит/яблочная кислота) (б) [150]

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

6.2.2. 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. 27 а). С помощью иерархического кластерного анализа (НСА) 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. 27 б). 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 (FDR) с использованием критерия Бенджамини-Хохберга (Benjamini-Hochberg method) при $p \leq 0,05$) выявил 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. 27 в).

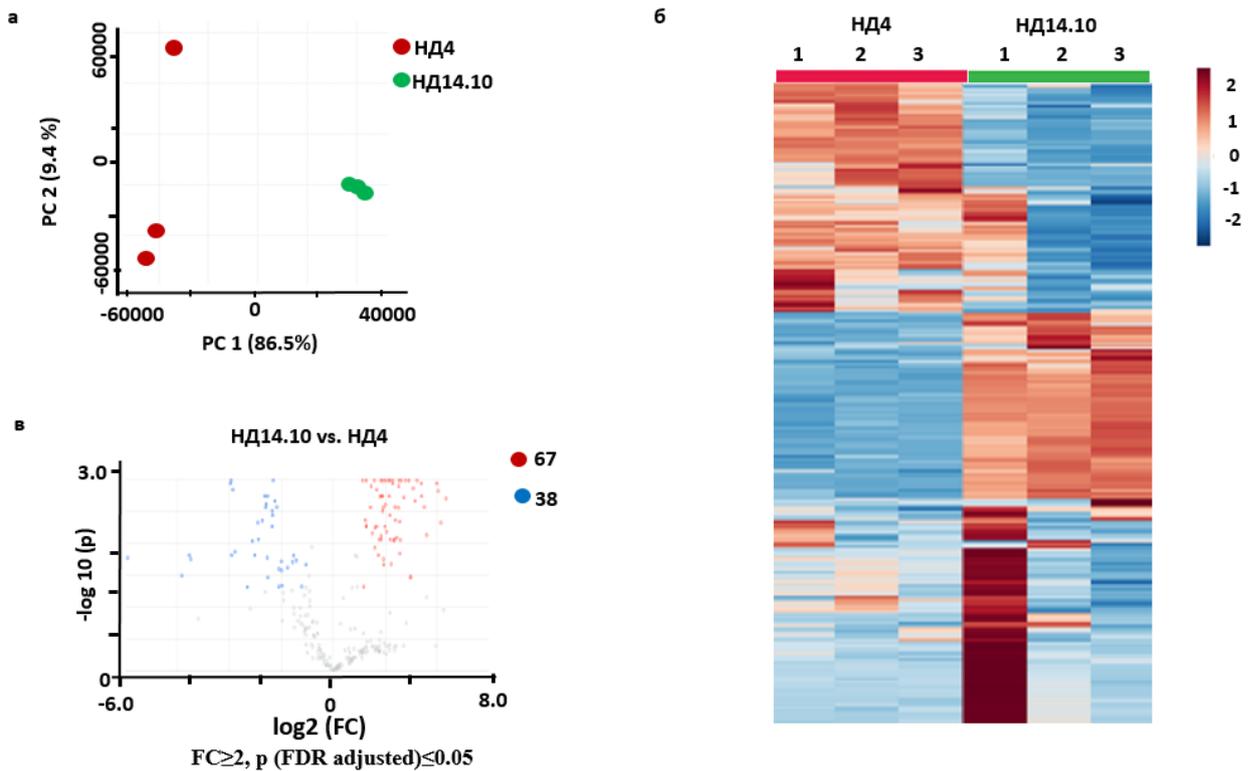


Рисунок 27 – Сравнение профилей вторичных метаболитов корней *Аралии маньчжурской*, извлеченных методом мацерации с НД4 и НД14.10: результаты анализа главных компонент (PCA) с графиком оценок (а), иерархического кластерного анализа с представлением тепловой карты (б) и volcano plot (в) [150]

Последующий анализ NADES извлечений с использованием метода УВЭЖХ-МС позволил идентифицировать 11 метаболитов (рис. 28), которые можно было охарактеризовать как отличающиеся по содержанию более чем в шесть раз, и интенсивностью хроматографических сигналов, превышающих 10^5 counts per second (отсчетов в секунду) (таблица 20).

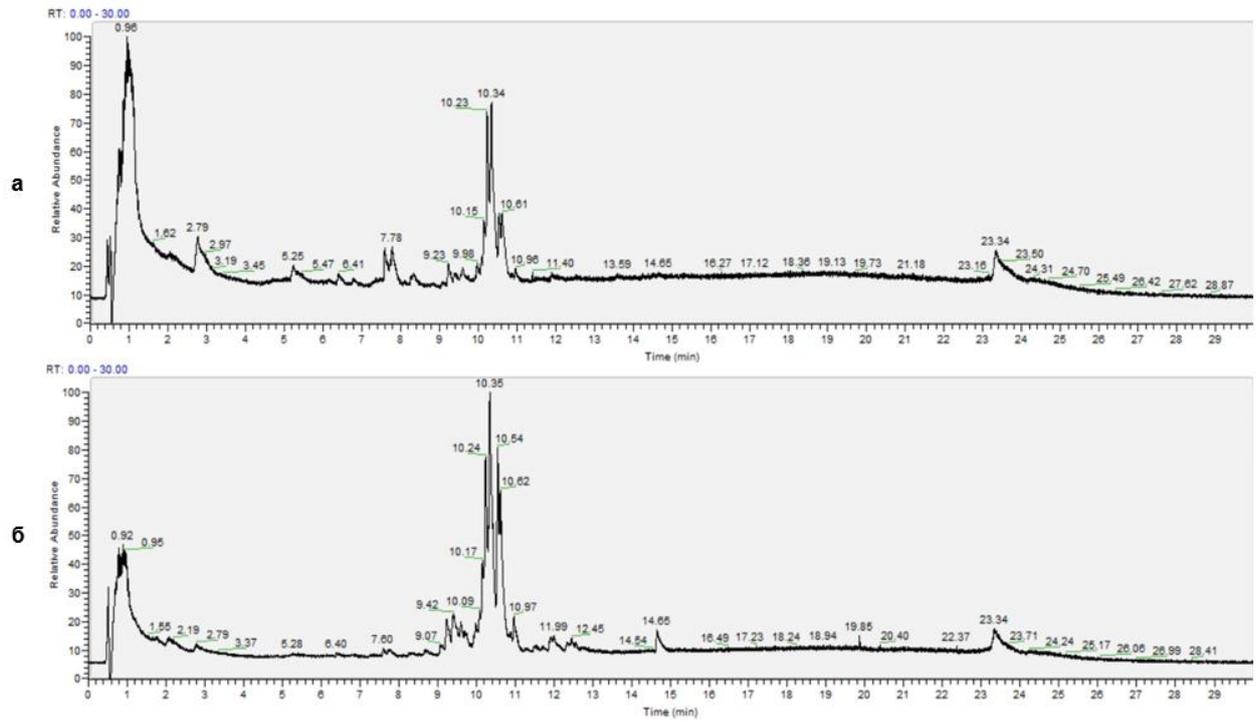


Рисунок 28 – Типичные хроматограммы извлечений (а) с холина хлоридом и яблочной кислотой (1:1), (б) с сорбитом и яблочной кислотой (1:1+10% воды)

Таблица 20. Идентифицированные метаболиты в извлечениях аралии маньчжурской с природными глубокими эвтектическими растворителями НД4 и НД14.10 в эксперименте сравнения при мацерации с помощью обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с тандемной масс спектрометрией в гибридном масс-анализаторе, основанном на комбинации электродинамической и орбитальной ионных ловушек в режиме отрицательно заряженных квази-молекулярных ионов [150]

№	tR (мин)	m/z [M-H] ⁻ экспериментальное	m/z [M-H] ⁻ расчетное	Элементный состав [M-H] ⁻	Характер фрагментации MS2 – дочерние ионы, m/z (относительная интенсивность, %)	Δm (ppm)	Соединение	Кратные изменения (log ₂ (FC))*
1	2,8	487,1089	487,1093	C ₂₀ H ₂₃ O ₁₄ ⁻	191,0546 (5), 295,0452 (5), 323,0779 (2), 353,0869 (100), 371,0973 (10), 469,0923 (7)	0,8	Малонилгидрокси-дигидрокофеилхинная кислота	2,9↓
2	2,9	469,0987	469,0988	C ₂₀ H ₂₁ O ₁₃ ⁻	191,0559 (10), 353,0878 (100)	0,3	Малонилкофеилхинная кислота	4,3↓
3	3,8	517,1586	517,1563	C ₂₂ H ₂₉ O ₁₄ ⁻	191,0559 (40), 309,0946 (5), 353,0871 (100)	-4,5	Пентофуранозил-дигидрокофеилхинная кислота	2,9↑
4	4,6	577,1634	577,1622	C ₂₀ H ₃₃ O ₁₉ ⁻	181,0716 (12), 261,0612 (9), 279,0716 (100), 297,0822 (33), 377,1450 (2), 443,1400 (10), 461,1507 (27), 559,1511 (5)	2,1	Производные мио-инозитола	2,9↑
5	5,5	225,0761	225,0768	C ₁₁ H ₁₃ O ₅ ⁻	107,0503 (5), 137,0973 (4), 163,0764 (15), 181,0869 (23), 207,0660 (100), 225,0761 (3)	1,0	3-гидрокси-5-(2-метокси-1-метилэтокси)бензоат	3,6↓
6	6,1	249,0550	249,0557	C ₁₆ H ₉ O ₃ ⁻	115,0038 (20), 133,0143 (100), 205,0504 (7), 231,0664 (3), 249,0550 (3)	2,8	Производное яблочной кислоты	3,4↓

7	6,1	705,1675	705,1672	$C_{32}H_{33}O_{18}^-$	339,0503 (3), 487,1212 (3), 513,1025 (100)	-0,4	Димер кофеилхинной кислоты	3,9↑
8	8,9	243,1237	243,1238	$C_{12}H_{19}O_5^-$	99,0089 (7), 181,1233 (10), 199,1338 (6), 207,1024 (5), 225,1129 (100), 243,1237 (6)	-0,4	Тригидрокси- додекадиеновая кислота	3,2↓
9	12,4	961,4589	961,4569	$C_{47}H_{74}ClO_{18}^-$	565,3505 (3), 631,3851 (3), 733,5586 (3), 763,4248 (10), 793,4357 (8), 925,4802 (100)	-2,1	Чикусетсусапонин IV (син. Аралозид А)	5,5↑
10	12,8	793,4367	793,4380	$C_{42}H_{65}O_{14}^-$	437,3418 (6), 455,3522 (65), 483,3470 (98), 551,3730 (63), 569,3835 (45), 631,3836 (20), 731,4355 (22), 793,4367 (100)	1,6	Гексуронид-гексозид олеаноловой кислоты	7,9↑
11	12,8	763,4286	763,4274	$C_{41}H_{63}O_{13}^-$	437,3411 (5), 455,3524 (30), 523,3785 (27), 569,3837 (65), 613,3735 (100), 632,3838 (15), 763,4286 (45)	-1,6	Псевдогинсенозид Rp1	5,5↑

*FC (кратное изменение) рассчитывалось как отношение относительного содержания метаболита в НД4 к относительному содержанию метаболита в НД14.10; $\log_2(FC)$ – двоичный логарифм кратного изменения.

В соответствии с данными, приведенными в таблице 20, относительные содержания соединений **3, 4, 7, 9, 10** и **11** в $2,9^2$ – $7,9^2$ раза превышают относительные содержания этих соединений в растворителе НД4, тогда как относительные содержания соединений **1, 2, 5, 6** и **8** – в $2,9^2$ – $4,3^2$ раза превышают содержания этих соединений в НД14.10. Таким образом, растворитель НД4 имеет более высокую относительную эффективность при методе мацерации.

Анализ PCA 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. 29 а). Иерархический кластерный анализ свидетельствует об относительно низком уровне внутригрупповой дисперсии, а также четком разделении и независимой кластеризации двух сравниваемых групп (рис. 29 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. 29 в).

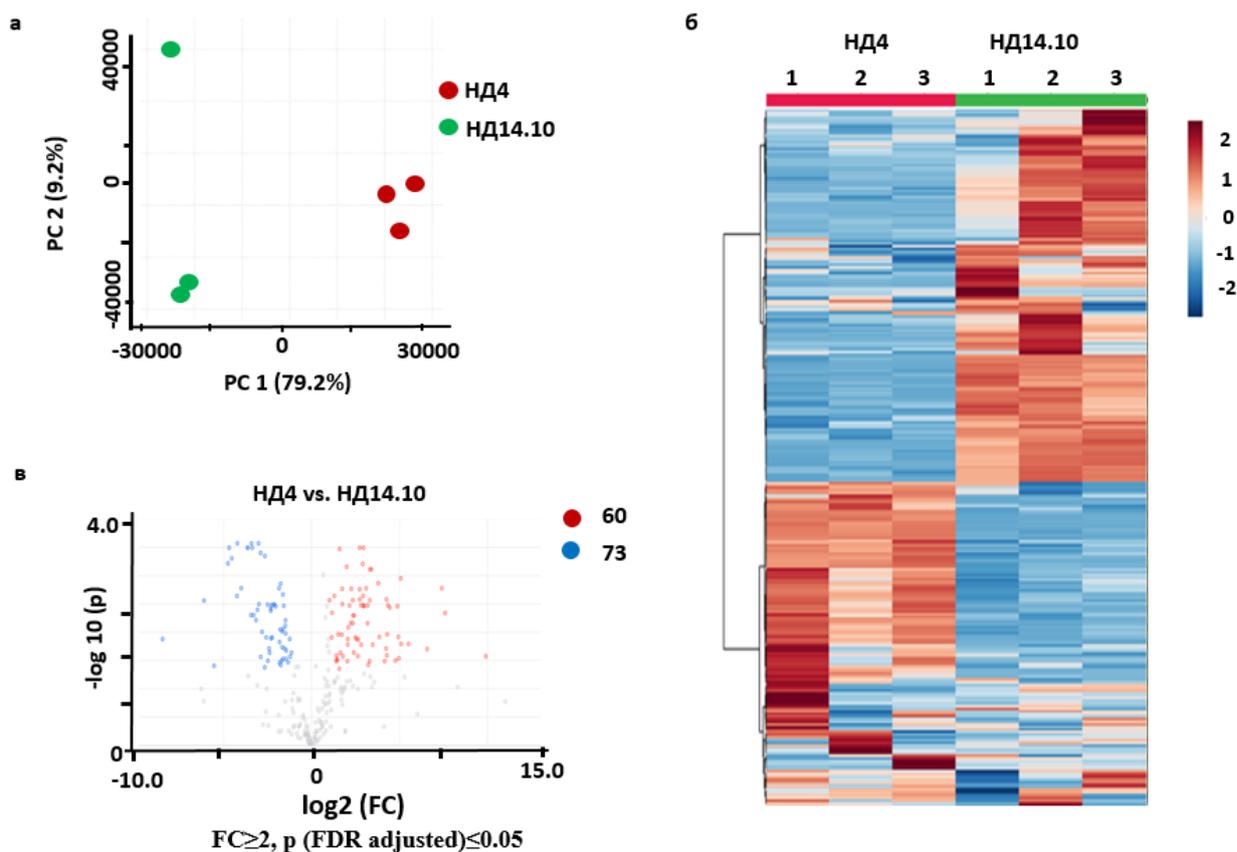


Рисунок 29 – Сравнение профилей вторичных метаболитов корней Аралии маньчжурской, экстрагированных при УЗЭ, с НД4 и НД14.10: результаты анализа главных компонент (РСА) с графиком оценок (а), иерархический кластерный анализ с представлением тепловой карты (б), и volcano plot (в) [150]

Данные РСА 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 (РС1) и 2 (РС2) соответственно (рис. 30 а). Иерархический кластерный анализ с представлением тепловой карты показал четкое разделение между двумя группами извлечений (рис. 30 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. 30 в).

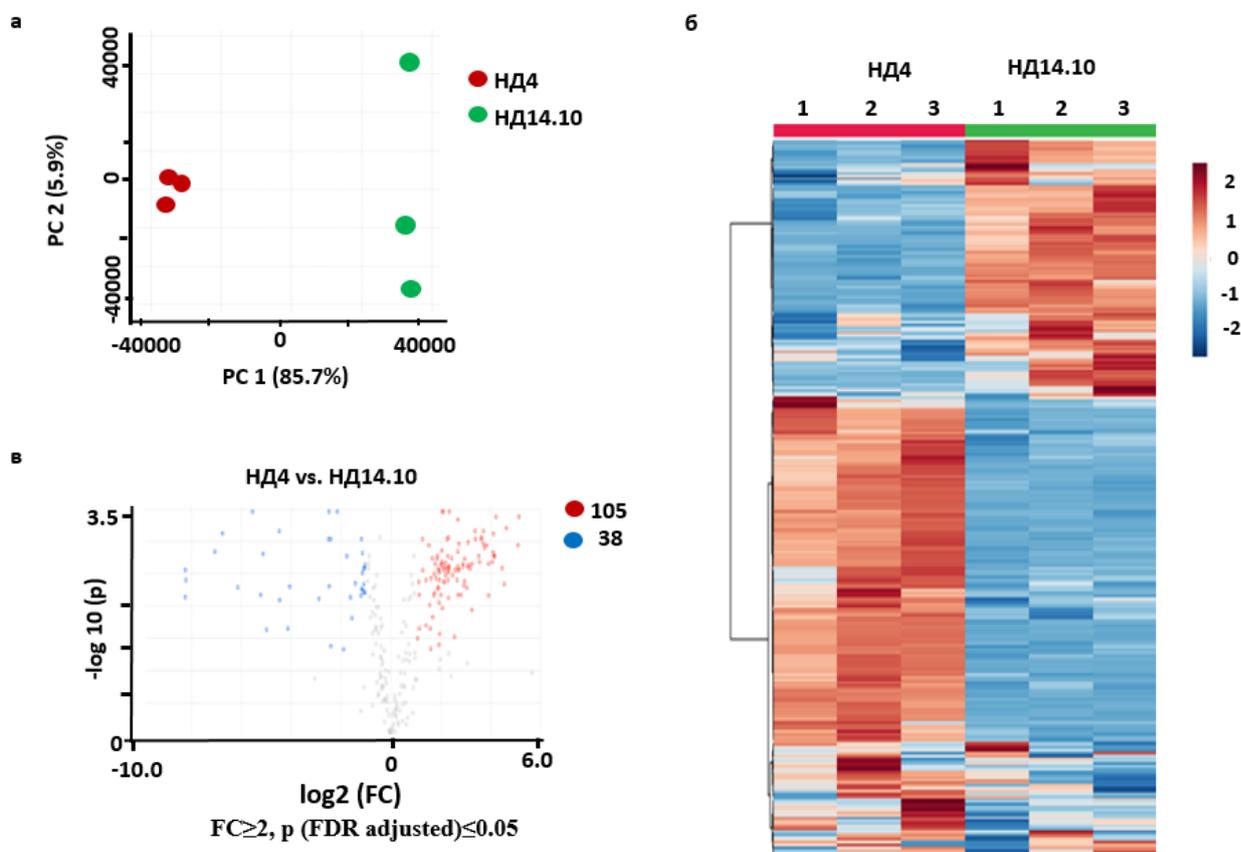


Рисунок 30 – Сравнение профилей вторичных метаболитов корней Аралии маньчжурской, извлеченных методом ВКЭ, с НД4 и НД14.10: результаты анализа главных компонент (PCA) с графиком оценок (а), иерархический кластерный анализ с представлением тепловой карты (б), и volcano plot (в)

[150]

Эффективность экстракции сильно зависит от состава NADES. За счет стимулирования-ингибирования молекулярных взаимодействий между растворителем и целевыми компонентами, растворимость метаболитов изменяется [153]. Тестируемые растворители содержат разные акцепторы водородных связей, и один и тот же донор – яблочную кислоту, эти двухкомпонентные системы имеют разную пространственную структуру, обладающую выраженным сродством преимущественно к разным

метаболитам. На растворимость БАВ оказывают влияние также различные физико-химические свойства растворителей, такие как полярность, вязкость, рН и другие [77].

6.2.3. Сравнение эффективности методов извлечения

Как видно из предыдущего раздела, растворитель НД4 показал лучшую эффективность по общему количеству экстрагированных метаболитов. Поэтому на третьем этапе мы сравнили эффективность различных методов экстракции в сочетании с НД4. Поскольку ВКЭ оказалась наиболее эффективной стратегией экстракции, мы оценили эффективность мацерации и УЗЭ с образцами, полученными с помощью ВКЭ.

РСА, выполненный для извлечений, полученных с помощью мацерации и виброкавитационной экстракции с растворителем НД4, показал хорошее разделение между двумя группами на соответствующем графике оценок. Анализ при сравнении выявил 89,5% и 5,7% от общей дисперсии, объясняемых главными компонентами 1 (PC1) и 2 (PC2) соответственно (рис. 31 а). Иерархический кластерный анализ (НСА) с представлением тепловой карты показал четкое разделение между анализируемыми группами (рис. 31 б). Сравнение спектра метаболитов по t-критерию с представлением volcano plot выявило увеличение содержания 3 и 46 метаболитов, демонстрирующих кратные изменения уровня содержания $FC \geq 10$, которые извлечены путем мацерации и ВКЭ соответственно (рис. 31 в).

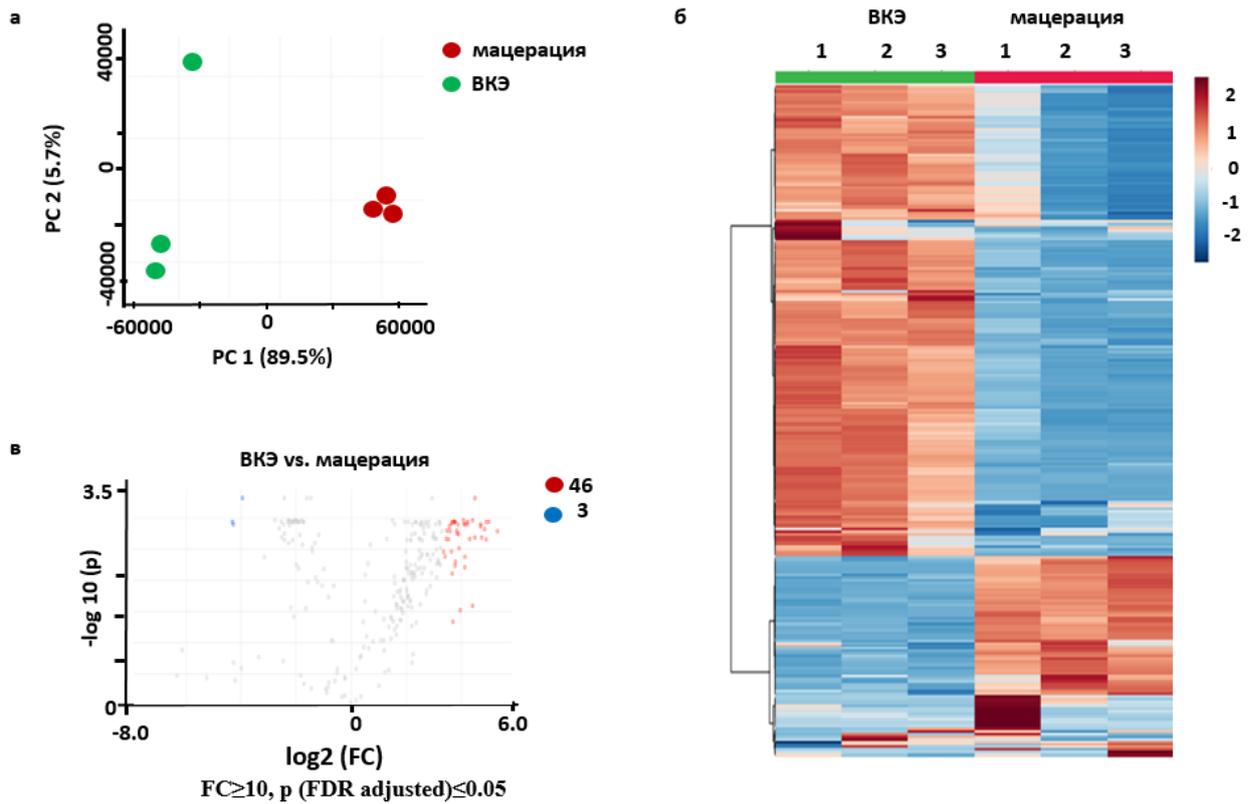


Рисунок 31 – Сравнение профилей вторичных метаболитов корней *Аралии маньчжурской*, экстрагированных методами ВКЭ и мацерации с использованием НД4: результаты анализа главных компонент (РСА) с графиком оценок (а), иерархический кластерный анализ с представлением тепловой карты (б), и volcano plot (в) [150]

При анализе NADES извлечений, полученных при мацерации и ВКЭ с использованием растворителя НД4 методом УВЭЖХ-МС, в общей сложности, было идентифицировано 17 метаболитов (рис. 32), которые можно было охарактеризовать как отличающиеся по содержанию более чем в десять раз, и интенсивностью хроматографических сигналов, превышающих 10^5 counts per second (отсчетов в секунду) (таблица 21).

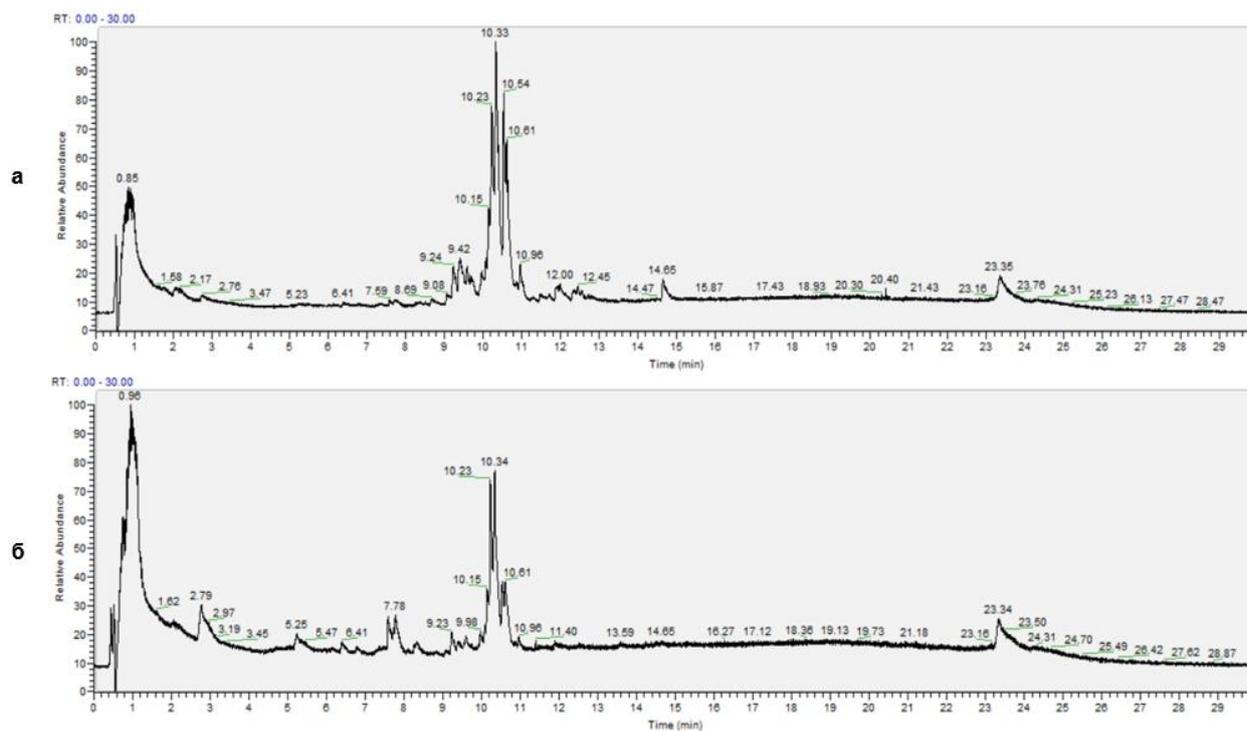


Рисунок 32 – Типичные хроматограммы извлечений с холина хлоридом и яблочной кислотой (1:1) при виброкавитационной экстракции (а), при мацерации (б)

Таблица 21. Идентифицированные метаболиты в извлечениях аралии маньчжурской с природным глубоким эвтектическим растворителем НД4 в эксперименте сравнения ВКЭ и мацерации с помощью обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с тандемной масс спектрометрией в гибридном масс-анализаторе, основанном на комбинации электродинамической и орбитальной ионных ловушек в режиме отрицательно заряженных квази-молекулярных ионов [150]

№	tR (мин)	<i>m/z</i> [M-H] ⁻ экспериментальное	<i>m/z</i> [M-H] ⁻ расчетное	Элементный состав [M-H] ⁻	Характер фрагментации MS2 – дочерние ионы, <i>m/z</i> (относительная интенсивность, %)	Δ <i>m</i> (ppm)	Соединение	Кратные изменения (log ₂ (FC))*
12	2,9	469,0987	469,0988	C ₂₀ H ₂₁ O ₁₃ ⁻	191,0559 (10), 353,0878 (100)	0,3	5- <i>O</i> -малонил-кофеилхинная кислота	4,3↓
13	9,3	1167,4970	1167,4996	C ₅₄ H ₈₄ ClO ₂₅ ⁻	697,3640 (3), 969,4656 (5), 1131,5182 (100)	2,2	Эфир 3,16-дигидроксиолеан-12-ен-23,28-диеновой кислоты 28- <i>O</i> -6- <i>O</i> -3-гидрокси-3-метилглутарил-гексопиранозил-гексопиранозил-гексопиранозила	3,5↑
14	9,4	1137,4930	1137,4890	C ₅₃ H ₈₂ ClO ₂₄ ⁻	823,8554 (3), 939,4536 (5), 975,4535 (5), 1101,5084 (100)	-3,5	Целозин I	3,8↑
15	9,6	1005,4430	1005,4467	C ₄₈ H ₇₄ ClO ₂₀ ⁻	688,4667 (3), 730,2089 (3), 842,4215 (5), 969,4651 (100)	3,7	3- <i>O</i> -гексопиранозил-гексопиранозил-гексуропиранозил мелилотигенин изомер 1	3,7↑
16	9,7	1007,4580	1007,4624	C ₄₈ H ₇₆ ClO ₂₀ ⁻	777,4055 (5), 799,3860 (20), 911,4629 (5), 939,4566 (25), 971,4799 (100)	4,4	Софорафлавозид II изомер 1	3,6↑
17	9,8	941,4707	941,4752	C ₄₇ H ₇₃ O ₁₉ ⁻	465,3363 (3), 537,3576 (15), 583,3629 (100), 627,3525	4,8	Дигидрогипсогенин 3- <i>O</i> -пентопиранозил-	3,7↑

					(35), 669,3629 (15), 733,4151 (5), 777,4045 (40), 819,4150 (10), 941,4707 (5)		гекспираноксил-гексуронопиранозид изомер 1	
18	10,5	955,4914	955,4908	$C_{48}H_{75}O_{19}^-$	455,3535 (5), 551,3747 (5), 569,3853 (12), 613,3745 (6), 748,4362 (7), 793,4387 (100), 834,4436 (8), 955,4914 (20)	-0,6	Календулагликозид С	5,0↑
19	11,3	1005,4440	1005,4467	$C_{48}H_{74}ClO_{20}^-$	404,2202 (3), 572,4813 (3), 842,4193 (3), 942,4771 (3), 969,4661 (100)	2,7	3- <i>O</i> -гексопиранозил-гексопиранозил-гексуронопиранозил меллотигенин изомер 2	4,7↑
20	11,5	1007,4573	1007,4624	$C_{48}H_{76}ClO_{20}^-$	939,4597 (3), 971,4816 (100)	5,0	Софорафлавозид II изомер 2	3,9↑
21	11,6	971,4841	971,4857	$C_{48}H_{75}O_{20}^-$	407,3312 (15), 471,3464 (10), 567,3672 (15), 747,4294 (10), 790,4078 (30), 809,4285 (45), 925,4777 (7), 971,4841 (100)	1,6	Софорафлавозид II изомер 3	3,7↑
22	12,1	941,4711	941,4752	$C_{54}H_{87}O_{24}$	565,3526 (10), 609,3419 (7), 745,4152 (87), 777,4048 (3), 807,4152 (30), 941, 4695 (100)	4,4	Дигидрогипсогенин 3- <i>O</i> -пентопиранозил-гекспираноксил-гексуронопиранозид изомер 2	3,8↑
23	12,3	961,4589	961,4569	$C_{47}H_{74}ClO_{18}^-$	455,3523 (35), 551,3732 (40), 565,3505 (3), 731,4357 (100), 763,4248 (10), 793,4357 (8), 925,4808 (65)	3,8	Чикусетсусапонин IV (син. Аралозид А)	4,7↑
24	12,6	845,4110	845,4096	$C_{42}H_{66}ClO_{15}^-$	407,3310 (50), 477,3728 (30), 539,3671 (20), 567,3671 (33), 587,3570 (50), 647,3779 (100), 747,4291 (8), 809,4301 (30)	-1,7	Илексозид XLVIII	3,9↑
25	12,7	777,4057	777,4067	$C_{41}H_{61}O_{14}^-$	469,3318 (3), 565,3526 (3), 583,3625 (15), 627,3519	1,3	3- <i>O</i> -гексопиранозил-пентопиранозилурс-12,18-диен-24,28-диеновая кислота	5,3↑

					(100), 645,3624 (20), 777,4057 (3)			
26	12,8	793,4367	793,4380	$C_{42}H_{65}O_{14}^-$	455,3522 (70), 483,3470 (100), 537,3574 (30), 551,3730 (65), 569,3834 (45), 613,3732 (20), 631,3835 (25), 731,4354 (25), 793,4367 (95)	1,6	Гексозид-гексуронид олеаноловой кислоты	3,9↑
27	12,9	779,4216	779,4223	$C_{41}H_{63}O_{14}^-$	455,3525 (3), 523,3778 (10), 585,3778 (35), 629,3673 (100), 647,3779 (20), 779,4216 (3)	0,9	3- <i>O</i> -пентопиранозил- гексуронопиранозил гедерагенин	3,8↑

*FC (кратное изменение) рассчитывалось как отношение относительного содержания метаболита при ВКЭ к относительному содержанию метаболита при мацерации; $\log_2(FC)$ – двоичный логарифм кратного изменения.

Согласно данным из таблицы 21, относительные содержания соединений **13–27** оказались в $3,5^2$ – $5,3^2$ раза выше при использовании ВКЭ, а относительное содержание соединения **12** – в $4,3^2$ раза выше при мацерации. Таким образом, ВКЭ оказалась более эффективным из двух методов экстракции.

Важно отметить, что, семь из идентифицированных соединений (**4, 8, 14, 16, 20, 21** и **25**) были найдены в корнях аралии маньчжурской впервые.

РСА, выполненный для образцов, полученных с помощью УЗЭ и ВКЭ с использованием НД4, показал четкое разделение между двумя группами на соответствующем графике оценок. Анализ при сравнении выявил 89% и 7,4% от общей дисперсии, объясняемых главными компонентами 1 (PC1) и 2 (PC2) соответственно (рис. 33 а). Иерархический кластерный анализ с представлением тепловой карты выявил низкий уровень внутригрупповой изменчивости и показал четкое разделение анализируемых групп (рис. 33 б). Сравнение двух групп с использованием t-критерия с представлением volcano plot показало увеличение содержания 108 и 1 метаболита, демонстрирующие кратные изменения уровня содержания $FC \geq 10$, которые извлечены путем ВКЭ и УЗЭ соответственно (рис. 33 в). Этот факт указывает на преимущество метода виброкавитационной экстракции перед ультразвуковой обработкой.

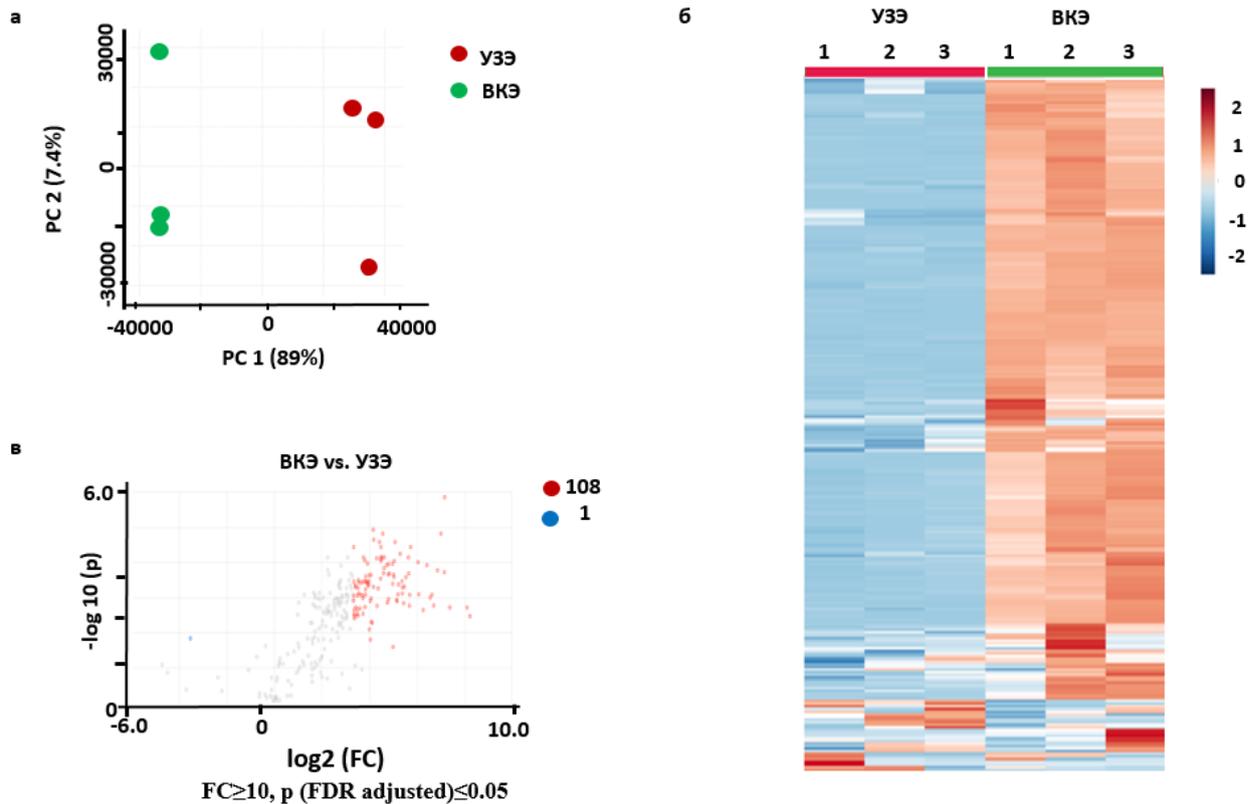


Рисунок 33 – Сравнение профилей вторичных метаболитов корней *Аралии маньчжурской*, экстрагированных методами ВКЭ и УЗЭ с использованием НД4: результаты анализа главных компонент (РСА) с графиком оценок (а), иерархический кластерный анализ с представлением тепловой карты (б), и *volcano plot* (в) [150]

Поскольку аралозиды А, В и С являются маркерными соединениями среди биологически активных компонентов аралии, рекомендованными Фармакопеями России и Белоруссии для контроля качества лекарственных форм [21], были получены хроматограммы селективных ионов (ХИС, $m/z \pm 0,02$) с m/z 925,4796, 1057,5255 и 1087,5308, соответствующих ионам $[M-H]^-$ 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. 34).

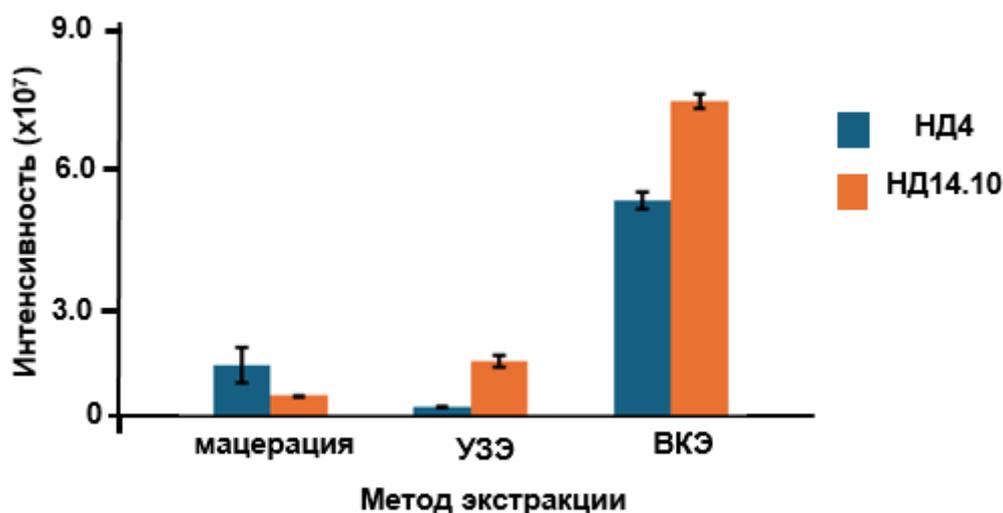


Рисунок 34 – Относительное общее содержание (оцененное по интенсивность MS–сигнала) аралозидов А, В и С в экстрактах, полученных методами мацерации, ультразвука (УЗЭ) и виброкавитационной экстракции (БКЭ) [150]

В этом эксперименте было подтверждено, что БКЭ является наиболее эффективным методом экстракции для извлечения трех маркерных аралозидов, тогда как мацерация и УЗЭ в целом были сопоставимы [150].

6.2.4. Расчеты энергопотребления процесса экстракции при различных методах

Для расчета энергозатрат (кВт*ч*г/мг) методов экстракции использовалась формула (3) [70,117].

$$Consumption = \frac{P \cdot t}{m \cdot 1000 \cdot 60} \quad (3)$$

где P – мощность оборудования, Вт;

t – время, ч;

m – количество сапонинов в экстракте, мг/г.

Данные для расчета и сравнение энергозатрат для трех методов экстракции приведены в таблице 22.

Таблица 22. Энергозатраты процесса экстракции при различных методах

	Мацерация	Ультразвуковая экстракция	Виброкавитационная экстракция
P , Вт	150	210	750
t , мин	40	40	5
m , мг/г	41,5	85,9	102,9
Энергозатраты, кВт*ч*г/мг	0,0024	0,0016	0,0006

Таким образом, метод виброкавитационной экстракции является наименее энергозатратным. Развитие технологии использования виброкавитационной экстракции совместно с природными глубокими эвтектическими растворителями соответствует приоритетным направлениям научно-технологического развития и перечню наукоемких технологий, утвержденных Указом Президента РФ №529 от 18.06.2024 г., в части, высокоэффективной и ресурсосберегающей энергетики, а также сохранения и рационального использования природных ресурсов.

6.2.5. Особенности методов экстракции

Основной механизм мацерации включает диффузию экстракционного растворителя в клетки, десорбцию клеточных метаболитов и миграцию растворенного вещества через клеточную мембрану в растворитель вокруг растительных клеток [39,154]. В случае ультразвуковой обработки этот механизм сопровождается частичным разрушением клеток, капиллярными звуковыми эффектами, акустическими микровихрями и локальными тепловыми эффектами [155]. УЗЭ в сочетании с NADES преимущественно используется для экстракции мягких частей растений, таких как цветы [156], надземные части растений [157] и листья [158]. Корни аралии маньчжурской имеют прочную ячеистую структуру, которая противостоит разрушению клеток ультразвуком и задерживает проникновение вязких растворителей. Для интенсификации экстракции необходимо механическое разрушение растительной матрицы. Уменьшение размера частиц приводит к увеличению поверхности контакта растворителя и сырья, что улучшает массообмен.

Как видно из представленных выше данных, процедура ВКЭ показала наибольшую эффективность экстракции корней по сравнению с мацерацией и

УЗЭ (рис. 30, 32). Процедура ВКЭ (рис. 24) сочетает в себе ультразвуковое воздействие и механическое измельчение растительного сырья с последующей интенсивной циркуляцией полученной мелкодисперсной суспензии с растворителем. Частицы растительного материала дополнительно измельчаются за счет механического воздействия при прохождении через зазор между ротором (рис. 24 3) и статором (рис. 24 2). 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 (рис. 24 5) 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 [49,159,160]. Эти явления помогают понять высокую эффективность экстракции NADES с помощью виброкавитатора [150].

6.3. Фармакологические эффекты, описанные для идентифицированных соединений

Основным классом соединений, на извлечение которых существенно влияли условия экстракции, были сапонины. Представители этой группы (а именно соединения **9–11, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 25, 26, 27** и аралозид С) были идентифицированы в корнях *A. маньчжурской* с помощью метода ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией с последующим МС/МС детектированием (таблицы 20, 21). Для соединений **9** и **23** (чикусецусапонин IV (синоним аралозид А)) описаны противораковые эффекты, проявляющиеся в ингибировании пролиферации клеток, замедлении остановки клеточного цикла и индукции клеточного апоптоза [161]. Для аралозида С описано кардиопротективное действие (защита кардиомиоцитов от гибели, вызываемое гипоксией/реоксигенацией, защита кардиомиобластов от окислительного стресса) [162-164]. Терпеноид 3-гидрокси-5-(2-метокси-1-метилэтокси)бензоат (**5**) проявляет антиоксидантные и антигликирующие свойства [165]. Соединения, идентифицированное как гексуронид-гексозид олеаноловой кислоты (**10** и **26**), и псевдогинзенозид Rp1 (**11**) известны как сапонины с выраженным противораковым действием и противовоспалительной активностью [166]. Сообщалось, что соединение **14** обладает гепатопротекторной и гипополипидемической активностью [167]. Противоопухолевая, противовоспалительная и противоотечная активность описаны для календулагликозида С (**18**) [168]. Обнаружено, что производные мелилотигенина (**15,19**) обладают противораковой активностью [169]. Илексозид XLVIII (**24**) проявляет ингибирующую активность в отношении ацил-КоА-холестерилацилтрансферазы [170]. Для соединения **27**, производного гедерагенина, наблюдается противоопухолевая активность [171]. В экспериментах на собаках установлен положительный инотропный эффект, улучшение коронарного кровотока и энергетического обмена после внутрижелудочного введения суммы тритерпеновых сапонинов из *Aralia elata*,

включая аралозид А, С, элатозид L и другие [172]. В экспериментах на крысах аралозид С ослаблял ишемическое/реперфузионное повреждение миокарда [173]. Согласно S. Xi и соавторам, сумма сапонинов *A. elata* предотвращает вызванную диабетом сердечную дисфункцию и патологические повреждения у крыс с индуцированным диабетом II типа [174]. Разработанный в СССР препарат «Сапарал» (сумма аммонийных солей аралозидов) рекомендован в качестве лекарственного средства при астенических, астенодепрессивных состояниях, неврастении, гипотензии, а также для профилактики и лечения умственного и физического переутомления [175].

Другая группа выявленных биоактивных природных веществ представлена фенилпропаноидами – пятью кофеилхиновыми кислотами (соединения **1**, **2**, **3**, **7** и **12**; таблица 20,21). Фармакологическое применение этих соединений связано с антиоксидантным, антибактериальным, противопаразитарным, нейропротекторным, противовоспалительным, противораковым, противовирусным и антидиабетическим действием [176].

Для миоинозитола (соединение **4**) описано участие в регуляции продукции активных форм кислорода и модуляции передача сигнала [177].

ВЫВОДЫ ГЛАВЫ 6

Проведен нецелевой анализ с применением принципа метаболомного профилирования. Эффективность мацерации, ультразвуковой и виброкавитационной экстракции сравнивали на уровне метаболомных профилей. По результатам анализа главных компонент и анализа иерархической кластеризации извлечений, установлено, что наиболее эффективный экстрагент – NADES (холина хлорида/яблочная кислота, 1:1), а виброкавитационный метод показал самую высокую эффективность экстракции метаболитов из корней аралии маньчжурской по сравнению с мацерацией и ультразвуковой обработкой. Всего в корнях аралии маньчжурской методом УВЭЖХ-МС идентифицировано 27 метаболитов. Семь из них обнаружены в корнях аралии впервые. Наши результаты указывают на высокую эффективность виброкавитатора для экстракции метаболитов аралии из грубого растительного сырья. Метод виброкавитационной экстракции является наименее энергозатратным.

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.

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, вероятно, за счет их деградации.

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 СОКРАЩЕНИЙ

Аралия маньчжурская – А. маньчжурская

DES – Deep Eutectic Solvents – глубокие эвтектические растворители

FC – fold changes – кратные изменения

FDR – false discovery rate – коэффициент ложного обнаружения

HCA – hierarchical cluster analysis – иерархический кластерный анализ

NADES – Natural Deep Eutectic Solvents – природные глубокие эвтектические растворители

PCA – principal component analysis – анализ главных компонент

ABC – акцептор водородной связи

БАВ – биологически активное вещество

ВКЭ – виброкавитационная экстракция

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации

ДВС – донор водородной связи

ЛРП – лекарственный растительный препарат

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ОФС – общая фармакопейная статья

РПА – роторно-пульсационный аппарат

СО – стандартный образец

СПХФУ – Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет

ТС – тритерпеновые сапонины

ТФУ – трифторуксусная кислота

УВЭЖХ-МС – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

УЗЭ – ультразвуковая экстракция

ФС – фармакопейная статья

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anastas, P. Green Chemistry: Principles and Practice / P. Anastas, N. Eghbali // Chemical Society Reviews. – 2010. – Vol. 39. – № 1. – P. 301-312.
2. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? / Y. H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dai [et al.] // Plant Physiology. – 2011. – Vol. 156. – № 4. – P. 1701-1705.
3. Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. / Y. Dai, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y. H. Choi // Analytical Chemistry. – 2013. – Vol. 85. – № 13. – P. 6272-6278.
4. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology / Y. Dai, J. van Spronsen, G.-J. Witkamp [et al.] // Analytica Chimica Acta. – 2013. – Vol. 766. – P. 61-68.
5. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications / Y. Dai, G.-J. Witkamp, R. Verpoorte, Y. H. Choi // Food Chemistry. – 2015. – Vol. 187. – P. 14-19.
6. Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products / L. Duan, L.-L. Dou, L. Guo [et al.] // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. – 2016. – Vol. 4. – № 4. – P. 2405-2411.
7. Identification of multiple components in deep eutectic solvent extract of *Acanthopanax senticosus* root by ultra-high-performance liquid chromatography with quadrupole orbitrap mass spectrometry / X. Shi, Y. Yang, H. Ren [et al.] // Phytochemistry Letters. – 2020. – Vol. 35. – P. 175-185.
8. Природные глубокие эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты для извлечения флоротанинов бурых водорослей / Е. Д. Облучинская, А. В. Даурцева, О. Н. Пожарицкая [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53. – № 3. – С. 45–49.
9. Экстракция фенилпропаноидов из *Rhodiola rosea* с помощью глубоких эвтектических растворителей / Н. С. Цветов, К. П. Мрясова, А. Л.

Шаварда, В. Г. Николаев // Труды Кольского научного центра РАН. – 2019. – Т. 10. – № 1-3. – С. 400-403.

10. Estimation of extraction efficiency of salidroside from *Rhodiola rosea* using deep eutectic solvents / N. S. Tsvetov, K. P. Mryasova, A. L. Shavarda, V. G. Nikolaev // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2019. – Vol. 315. – № 4. – P. 042002.

11. Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Phenyletanes and Phenylpropanoids of *Rhodiola rosea* L. / A. N. Shikov, V. M. Kosman, E. V. Flissyuk [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – № 8. – P. 1826.

12. Efficacy of natural deep eutectic solvents for extraction of hydrophilic and lipophilic compounds from *Fucus vesiculosus* / E. D. Obluchinskaya, O. N. Pozharitskaya, L. V. Zakharova [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – № 14. – P. 4198.

13. Optimization of Extraction of Phlorotannins from the Arctic *Fucus vesiculosus* Using Natural Deep Eutectic Solvents and Their HPLC Profiling with Tandem High-Resolution Mass Spectrometry / E. D. Obluchinskaya, O. N. Pozharitskaya, V. A. Shevyrin [et al.] // Marine Drugs. – 2023. – Vol. 21. № 5. – P. 263.

14. Слесарев, Г. П. Оценка природных глубоких эвтетических растворителей для экстракции изофлавоноидов из соевой мелассы / Г. П. Слесарев, Е. Г. Ковалева, К. С. Дуру // Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии : материалы очных докладов Международной научной конференции, Екатеринбург, 18–21 ноября 2020 года. – Екатеринбург: Общество с ограниченной ответственностью «ИЗДАТЕЛЬСТВО АМБ», 2020. – С. 668-670.

15. Природные глубокие эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты флавоноидов из растительного сбора седативного действия / М. А. Джавахян, Ю. Э. Прожогина, О. К. Павельева, Е.

И. Каленикова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11. – № 3. – С. 75-83.

16. WFO Plant List | World Flora Online. – URL: <https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-0000257096-2023-12?page=1> (дата обращения: 31.01.2024). – Текст : электронный.

17. Деревья и кустарники. Энциклопедия природы России. – URL: <https://www.booksite.ru/localtxt/tre/esa/ndb/ush/index.htm> (дата обращения: 13.03.2024). – Текст : электронный.

18. Депозитарий: Образец коллекции [Гербарий МГУ]. – URL: <https://plant.depo.msu.ru/open/module/itempublic?d=P&openparams=%5Bopen-id%3D3333232%5D> (дата обращения: 13.03.2024). – Текст : электронный.

19. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicity and quality control of medicinal genus *Aralia*: A review / Y. Xu, J. Liu, Y. Zeng [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2022. – Vol. 284. – P. 114671. Li, J.

20. Accumulation and Dynamic Trends of Triterpenoid Saponin in Vegetative Organs of *Achyranthus bidentata* / J. Li, Z. Hu // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2009. – Vol. 51. – № 2. – P. 122-129.

21. The standardization of officinal medicinal plants used in the Eurasian Economic Union: comparison with other pharmacopoeias / A. O. Whaley, A. K. Whaley, E. L. Kovaleva [et al.] // *Phytochemistry Reviews*. – 2023.

22. Турова, А. Д. Лекарственные растения СССР и их применения / А. Д. Турова. – 2-е изд., перераб. – М. : Медицина, 1974. – 436 с.

23. Яременко, К. В. Учение Н. В. Лазарева о СНПС и адаптогенах как базовая теория профилактической медицины / К. В. Яременко // *Психофармакология и биологическая наркология*. — 2005. — Т. 5. — № 4. — С. 1086-1092.

24. Состояние Неспецифически Повышенной Сопротивляемости / Н. В. Лазарев, Е. И. Люблина, М. А. Розин // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. — 1959. — Т. 3. — № 4. — С. 16-21.

25. Брехман, И. И. Элеутерококк / И. И. Брехман. — Л.: Наука, 1968 — 168 с.
26. Panossian, A. Novel molecular mechanisms for the adaptogenic effects of herbal extracts on isolated brain cells using systems biology / A. Panossian, E.-J. Seo, T. Efferth // *Phytomedicine*. – 2018. – Vol. 50. – P. 257-284.
27. Шабанов, П. Д. Адаптогены и антигипоксанты / П. Д. Шабанов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2003. – Т. 2. – № 3. – С. 50-81.
28. Авторское свидетельство № 238097 СССР, МПК А 61 К 35/78. Лечебный препарат : № 752972 : заявл. 23.11.1961 : опубл. 20.11.1969 / Соколов С. Я, Турова А. Д. – 1 с.
29. Розенцвейг, П. Э. Технология лекарств и галеновых препаратов / П. Э. Розенцвейг, Ю. К. Сандер. – Л. : Медицина. Ленинградское отделение, 1967. – 772 с.
30. Extraction of Natural Products: Principles and Fundamental Aspects / M. Palma, G. F. Barbero, Z. Piñeiro [et al.] // *Green Chemistry Series* / ed. Rostagno M. A., Prado J. M. – Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2013. – Chapter 2. Extraction of Natural Products. – P. 58-88.
31. Алексеев, К. В. Фармацевтическая технология: учебник / К. В. Алексеев, С. А. Кедик. – 2-е, перераб. и дополн. – М. : АО ИФТ, 2022. – 768 с.
32. Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries : Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition / ed. S. S. H. Rizvi. – Cambridge : Woodhead Publishing, 2010. – 102. – 694 p.
33. Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications / ed. M. A. A. Meireles. – Boca Raton : CRC Press, 2008. – 464 p.

34. Mandal, S. C. Chapter 5. Extraction of Botanicals / S. C. Mandal, V. Mandal, A. K. Das // *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications*. – Oxford : Academic Press, 2015. – P. 63-82.

35. Методы экстракции биологически активных веществ из растительного сырья (обзор) / И. А. Абашкин, Ю. А. Елеев, Е. Н. Глухан [и др.] // *Химия и технология органических веществ*. – 2021. – № 2 (18).

36. Mandal, S. C. Chapter 6. Classification of Extraction Methods / S. C. Mandal, V. Mandal, A. K. Das // *Essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications*. – Oxford : Academic Press, 2015. – P. 83-136.

37. Применение сверхкритической экстракции для выделения химических соединений / Н. В. Меньшутина, И. В. Казеев, А. И. Артемьев [и др.] // *Известия Высших Учебных Заведений. Серия: Химия и химическая технология*. – 2021. – Т. 64. – № 6. – С. 4-19.

38. Современные методы экстрагирования лекарственного растительного сырья (обзор) / С. С. Белокуров, И. А. Наркевич, Е. В. Флисюк [и др.] // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2019. – Т. 53. – № 6. – С. 48-53.

39. Methods of extraction of medicinal plants / A. N. Shikov, I. Yu. Mikhailovskaya, I. A. Narkevich [et al.] // *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*. – Oxford : Elsevier, 2022. – P. 771-796.

40. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction / M. Toma, M. Vinatoru, L. Paniwnyk, T. J. Mason // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2001. – Vol. 8. – № 2. – P. 137-142.

41. Xi, J. Recent advances in continuous extraction of bioactive ingredients from food-processing wastes by pulsed electric fields / J. Xi, Z. Li, Y. Fan // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2021. – Vol. 61. – № 10. – P. 1738-1750.

42. Lakshmanan, M. Plant Extraction Methods / M. Lakshmanan // *Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology* / eds. M. Lakshmanan [et al.]. – Singapore : Springer Nature Singapore, 2022. – P. 773-783.

43. Optimized extraction of calcium malate from eggshell treated by PEF and an absorption assessment in vitro / S. Lin, L. Wang, G. Jones [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2012. – Vol. 50. – № 5. – P. 1327-1333.
44. A Critical Review on Pulsed Electric Field: A Novel Technology for the Extraction of Phytoconstituents / M. M. A. N. Ranjha, R. Kanwal, B. Shafique [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 16. – P. 4893.
45. Rutkowska, M. Ultrasound-Assisted Extraction / M. Rutkowska, J. Namieśnik, P. Konieczka // *The Application of Green Solvents in Separation Processes*. – Amsterdam : Elsevier, 2017. – P. 301-324.
46. Pingret, D. Chapter 3. Ultrasound-assisted Extraction / D. Pingret, A. Fabiano-Tixier, F. Chemat // *Agricultural and Food Sciences* / eds. M. A. Rostagno, J. M. Prado. – Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2013. – P. 89-112.
47. Destandau, E. Chapter 4. Microwave-assisted Extraction / E. Destandau, T. Michel, C. Elfakir // *Natural Product Extraction* / eds. M. A. Rostagno, J. M. Prado. – Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2013. – P. 113-156.
48. Lopez-Avila, V. Microwave-Assisted Extraction / V. Lopez-Avila, M. D. Luque De Castro // *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. – Amsterdam : Elsevier, 2014. – P. 1-17.
49. Сравнительный анализ перспективных методов экстрагирования для получения извлечения из семян пажитника сенного / С. С. Белокуров, Е. В. Флисюк, И. А. Наркевич [и др.] // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2019. – Т. 8. – № 3. – С. 49-55.
50. Шиков, А. Н. Разработка модели математического описания фракционного состава и поверхности контакта фаз при экстрагировании растительного сырья в роторно-пульсационном аппарате / А. Н. Шиков // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2006. – Т. 40. – № 7. – С. 385-388.

51. Сравнительное изучение содержания флавоноидов и кумаринов в некоторых препаратах ромашки аптечной / В. М. Косман, О. Н. Пожарицкая, А. Н. Шиков, В. Г. Макаров // Химия растительного сырья. – 2015. – № 1. – С. 107-112.

52. Antibacterial activity of *Chamomilla recutita* oil extract against *Helicobacter pylori* / A. N. Shikov, O. N. Pozharitskaya, V. G. Makarov, A. S. Kvetnaya // Phytotherapy Research. – 2008. – Vol. 22. – № 2. – P. 252-253.

53. Anti-inflammatory effect of *Pinus sibirica* oil extract in animal models / A. N. Shikov, O. N. Pozharitskaya, V. G. Makarov, M. N. Makarova // Journal of Natural Medicines. – 2008. – Vol. 62. – № 4. – P. 436-440.

54. Introduction: Ionic Liquids / Z. Lei, B. Chen, Y.-M. Koo, D. R. MacFarlane // Chemical Reviews. – 2017. – Vol. 117. – № 10. – P. 6633-6635.

55. Shamsuri, A. A. Ionic liquids: Preparations and limitations / A. A. Shamsuri // Makara of Science Series. – 2011. – Vol. 14. – № 2. – P. 101-106.

56. 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 [et al.] // Chemical communications. – 2001. – №. 19. – С. 2010-2011.

57. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures / A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies [et al.] // Chemical Communications. – 2003. – № 1. – P. 70-71.

58. Глубокие эвтектические растворители в биотехнологии / О. В. Морозова, И. С. Васильева, Г. П. Шумакович [и др.] // Успехи биологической химии. – 2023. – Т. 63. – № 9. – С. 301-348.

59. Kalhor, P. Deep Eutectic Solvents for Pretreatment, Extraction, and Catalysis of Biomass and Food Waste / P. Kalhor, K. Ghandi // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – № 22. – P. 4012.

60. Natural Deep Eutectic Solvents (NADES): Phytochemical Extraction Performance Enhancer for Pharmaceutical and Nutraceutical Product Development

/ N. P. E. Hikmawanti, D. Ramadon, I. Jantan, A. Mun'im // *Plants*. – 2021. – Vol. 10. – № 10. – P. 2091.

61. *Deep Eutectic Solvents for Medicine, Gas Solubilization and Extraction of Natural Substances : Environmental Chemistry for a Sustainable World*. Vol. 56 / eds. S. Fourmentin, M. Costa Gomes, E. Lichtfouse. – Cham : Springer International Publishing, 2021. – 312 p.

62. *Eutectic-Based Ionic Liquids with Metal-Containing Anions and Cations* / A. P. Abbott, J. C. Barron, K. S. Ryder, D. Wilson // *Chemistry*. – 2007. – Vol. 13. – № 22. – P. 6495-6501.

63. *Smith, E. L. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications* / E. L. Smith, A. P. Abbott, K. S. Ryder // *Chemical Reviews*. – 2014. – Vol. 114. – № 21. – P. 11060-11082.

64. *Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents* / M. Hayyan, M. A. Hashim, M. A. Al-Saadi [et al.] // *Chemosphere*. – 2013. – Vol. 93. – № 2. – P. 455-459.

65. *Application of natural deep eutectic solvents for the “green” extraction of vanillin from vanilla pods* / C. G. González, N. R. Mustafa, E. G. Wilson [et al.] // *Flavour and Fragrance Journal*. – 2018. – Vol. 33. – № 1. – P. 91-96.

66. *Mohd Fuad, F. Hydrophilic natural deep eutectic solvent : A review on physicochemical properties and extractability of bioactive compounds* / F. Mohd Fuad, M. Mohd Nadzir, A. Harun@Kamaruddin // *Journal of Molecular Liquids*. – 2021. – Vol. 339. – P. 116923.

67. *Phenolic hydrogen bond donors in the formation of non-ionic deep eutectic solvents: the quest for type V DES* / D. O. Abranches, M. A. R. Martins, L. P. Silva [et al.] // *Chemical Communications*. – 2019. – Vol. 55. – № 69. – P. 10253-10256.

68. *Freeze-Drying of Aqueous Solutions of Deep Eutectic Solvents: A Suitable Approach to Deep Eutectic Suspensions of Self-Assembled Structures* /

M. C. Gutiérrez, M. L. Ferrer, C. R. Mateo, F. Del Monte // *Langmuir*. – 2009. – Vol. 25. – № 10. – P. 5509-5515.

69. Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and Carboxylic Acids / C. Florindo, F. S. Oliveira, L. P. N. Rebelo [et al.] // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2014. – Vol. 2. – № 10. – P. 2416-2425.

70. Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods / A. P. R. Santana, J. A. Mora-Vargas, T. G. S. Guimarães [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2019. – Vol. 293. – P. 111452.

71. Farooq, M. Q. Deep eutectic solvents in separations: Methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography / M. Q. Farooq, N. M. Abbasi, J. L. Anderson // *Journal of Chromatography A*. – 2020. – Vol. 1633. – P. 461613.

72. A Greener Approach to Prepare Natural Deep Eutectic Solvents / F. J. V. Gomez, M. Espino, M. A. Fernández, M. F. Silva // *ChemistrySelect*. – 2018. – Vol. 3. – № 22. – P. 6122-6125.

73. Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids / A. P. Abbott, D. Boothby, G. Capper [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – Vol. 126. – № 29. – P. 9142-9147.

74. Degradation of Deep-Eutectic Solvents Based on Choline Chloride and Carboxylic Acids / N. Rodriguez Rodriguez, A. Van Den Bruinhorst, L. J. B. M. Kollau [et al.] // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2019. – Vol. 7. – № 13. – P. 11521-11528.

75. Preparation strategy and stability of deep eutectic solvents: A case study based on choline chloride-carboxylic acid / M. Zhang, R. Tian, H. Han [et al.] // *Journal of Cleaner Production*. – 2022. – Vol. 345. – P. 131028.

76. Martins, M. A. R. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures / M. A. R. Martins, S. P. Pinho, J. A. P. Coutinho // *Journal of Solution Chemistry*. – 2019. – Vol. 48. – № 7. – P. 962-982.
77. Ferreira, C. A Comprehensive Review on Deep Eutectic Solvents and Its Use to Extract Bioactive Compounds of Pharmaceutical Interest / C. Ferreira, M. Sarraguça // *Pharmaceuticals*. – 2024. – Vol. 17. – № 1. – P. 124.
78. Tang, B. Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples / B. Tang, H. Zhang, K. H. Row // *Journal of Separation Science*. – 2015. – Vol. 38. – № 6. – P. 1053-1064.
79. Abbott, A. P. Application of Hole Theory to the Viscosity of Ionic and Molecular Liquids / A. P. Abbott // *ChemPhysChem*. – 2004. – Vol. 5. – № 8. – P. 1242-1246.
80. Deep Eutectic Solvents: Physicochemical Properties and Gas Separation Applications / G. García, S. Aparicio, R. Ullah, M. Atilhan // *Energy & Fuels*. – 2015. – Vol. 29. – № 4. – P. 2616-2644.
81. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications / Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, F. Jérôme // *Chemical Society Reviews*. – 2012. – Vol. 41. – № 21. – P. 7108.
82. Physicochemical Properties, Cytotoxicity, and Antioxidative Activity of Natural Deep Eutectic Solvents Containing Organic Acid / M. Panić, K. Radošević, I. Radojčić Redovniković [et al.] // *Chemical & biochemical engineering quarterly*. – 2019. – Vol. 33. – № 1. – P. 1-18.
83. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review / M. H. Zainal-Abidin, M. Hayyan, A. Hayyan, N. S. Jayakumar // *Analytica Chimica Acta*. – 2017. – Vol. 979. – P. 1-23.
84. Enhanced and green extraction of bioactive compounds from *Lippia citriodora* by tailor-made natural deep eutectic solvents / M. Ivanović [et al.] // *Food Research International*. – 2018. – Vol. 111. – P. 67–76.

85. Natural deep eutectic solvents as new green solvents to extract anthraquinones from *Rheum palmatum* L. / Y. C. Wu [et al.] // RSC Advances. – 2018. – Vol. 8. – № 27. – P. 15069–15077.

86. Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins / T. Bosiljkov [et al.] // Food and Bioproducts Processing. – 2017. – Vol. 102. – P. 195–203.

87. Alrugaibah, M. Use natural deep eutectic solvents as efficient green reagents to extract procyanidins and anthocyanins from cranberry pomace and predictive modeling by RSM and artificial neural networking / M. Alrugaibah, Y. Yagiz, L. Gu // Separation and Purification Technology. – 2021. – Vol. 255. – P. 117720.

88. Green and Efficient Ultrasonic-Assisted Extraction of Bioactive Components from *Salvia miltiorrhiza* by Natural Deep Eutectic Solvents / X. He [et al.] // Molecules. – 2019. – Vol. 25. – № 1. – P. 140.

89. Polyphenolic Compounds Extracted and Purified from *Buddleja Globosa Hope* (Buddlejaceae) Leaves Using Natural Deep Eutectic Solvents and Centrifugal Partition Chromatography / J. Torres-Vega [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – № 8. – P. 2192.

90. Natural deep eutectic solvents ultrasound-assisted extraction (NADES-UAE) of trans-cinnamaldehyde and coumarin from cinnamon bark [*Cinnamomum burmannii* (Nees T. Nees) Blume] / A. Nadhira [et al.] // Journal of Research in Pharmacy. – 2020. – Vol. 24. – № 3. – P. 389–398.

91. Efficacy of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction of Hydrophilic and Lipophilic Compounds from *Fucus vesiculosus* / E. D. Obluchinskaya [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – № 14. – P. 4198.

92. Patil, S. S. Optimization and kinetic study of ultrasound assisted deep eutectic solvent based extraction: A greener route for extraction of curcuminoids from *Curcuma longa* / S. S. Patil, A. Pathak, V. K. Rathod // Ultrasonics Sonochemistry. – 2021. – Vol. 70. – P. 105267.

93. Natural deep eutectic solvent formulations for spirulina: Preparation, intensification, and skin impact / L. Wils [et al.] // *Algal Research*. – 2021. – Vol. 56. – P. 102317.
94. Insights on the potential of natural deep eutectic solvents (NADES) to fine-tune durian seed gum for use as edible food coating / X. Fang [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2022. – Vol. 132. – P. 107861.
95. Ultrasound-assisted extraction of bioactive alkaloids from *Phellodendri amurensis* cortex using deep eutectic solvent aqueous solutions / Y. Li [et al.] // *New Journal of Chemistry*. – 2020. – Vol. 44. – № 22. – P. 9172–9178.
96. Environmentally Friendly Extraction of Bioactive Compounds from *Mentha arvensis* Using Deep Eutectic Solvent as Green Extraction Media / Z. Naseem [et al.] // *Polish Journal of Environmental Studies*. – 2020. – Vol. 29. – № 5. – P. 3749–3757.
97. Development of a colorless *Centella asiatica* (L.) Urb. extract using a natural deep eutectic solvent (NADES) and microwave-assisted extraction (MAE) optimized by response surface methodology / S. Phaisan, F. Makkliang, W. Putalun [et al.] // *RSC Advances*. – 2021. – Vol. 11. – № 15. – P. 8741-8750.
98. Lanjekar, K. J. Green extraction of Glycyrrhizic acid from *Glycyrrhiza glabra* using choline chloride based natural deep eutectic solvents (NADESs) / K. J. Lanjekar, V. K. Rathod // *Process Biochemistry*. – 2021. – Vol. 102. – P. 22-32.
99. Lanjekar, K. J. Application of Ultrasound and Natural Deep Eutectic Solvent for the Extraction of Glycyrrhizic Acid from *Glycyrrhiza glabra*: Optimization and Kinetic Evaluation / K. J. Lanjekar, V. K. Rathod // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2021. – Vol. 60. – № 26. – P. 9532-9538.
100. Ribeiro, B. D. Extraction of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*) with cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents / B. D. Ribeiro, M. A. Z. Coelho, I. M. Marrucho // *European Food Research and Technology*. – 2013. – Vol. 237. – № 6. – P. 965-975.

101. Broad range chemical profiling of natural deep eutectic solvent extracts using a high-performance thin layer chromatography–based method / X. Liu, S. Ahlgren, H. A. A. J. Korthout [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2018. – Vol. 1532. – P. 198-207.

102. Comprehensive evaluation on tailor-made deep eutectic solvents (DESs) in extracting tea saponins from seed pomace of *Camellia oleifera* Abel / Y. Tang, X. He, J. Sun [et al.] // *Food Chemistry*. – 2021. – Vol. 342. – P. 128243.

103. Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of Bioactive Steroidal Saponins from *Dioscoreae Nipponicae* Rhizoma / G.-Y. Yang, J.-N. Song, Y.-Q. Chang [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 7. – P. 2079.

104. Lactic acid-based deep eutectic solvent: An efficient green media for the selective extraction of steroidal saponins from *Trillium govanianum* / P. S. Suresh, P. P. Singh, Anmol [et al.] // *Separation and Purification Technology*. – 2022. – Vol. 294. – P. 121105.

105. Extraction and identification of steroidal saponins from *Polygonatum cyrtonema* Hua using natural deep eutectic solvent-synergistic quartz sand assisted extraction method / G. Liu, S. Feng, M. Sui [et al.] // *Journal of Separation Science*. – 2023. – Vol. 46. – № 7. – P. 2200823.

106. Natural deep eutectic solvents-based selective extraction of saponins from *Panax notoginseng*: Process optimization, chemical profiling, and bioactivities evaluation / M. Li [et al.] // *Separation and Purification Technology*. – 2024. – Vol. 341. – P. 126882.

107. The Extraction Using Deep Eutectic Solvents and Evaluation of Tea Saponin / J. Guo [et al.] // *Biology*. – 2024. – Vol. 13. – № 6. – P. 438.

108. Extraction optimization of tea saponins from *Camellia oleifera* seed meal with deep eutectic solvents: Composition identification and properties evaluation / X. Yu [et al.] // *Food Chemistry*. – 2023. – Vol. 427. – P. 136681.

109. Sustainable ultrasound-assisted extraction of *Polygonatum sibiricum* saponins using ionic strength-responsive natural deep eutectic solvents / H. Zhang [et al.] // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2023. – Vol. 100. – P. 106640.

110. Widely targeted metabolomic and KEGG analyses of natural deep eutectic solvent-based saponins extraction from *Camellia oleifera* Abel.: Effects on composition / Z. Wei [et al.] // *Food Chemistry*. – 2024. – Vol. 450. – P. 139333.

111. Mohd Fuad, F., Mohd Nadzir, M. Ultrasound-assisted extraction of asiaticoside from *Centella asiatica* using betaine-based natural deep eutectic solvent / F. Mohd Fuad, M. Mohd Nadzir // *Industrial Crops and Products*. – 2023. – Vol. 192. – P. 116069.

112. Optimization of green deep eutectic solvent (DES) extraction of *Chenopodium quinoa* Willd. husks saponins by response surface methodology and their antioxidant activities / Y.-Q. Cai [et al.] // *RSC Advances*. – 2023. – Vol. 13. – № 42. – P. 29408–29418.

113. A high-permeability method for extracting purple yam saponins based on ultrasonic-assisted natural deep eutectic solvent / Y.-J. Hou [et al.] // *Food Chemistry*. – 2024. – Vol. 457. – P. 140046.

114. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents / K. Radošević [et al.] // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2015. – Vol. 112. – P. 46–53.

115. Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents / R. Craveiro [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2016. – Vol. 215. – P. 534–540.

116. An experimental and theoretical investigation of the physicochemical properties on choline chloride – Lactic acid based natural deep eutectic solvent (NADES) / R. Alcalde, A. Gutiérrez, M. Atilhan, S. Aparicio // *Journal of Molecular Liquids*. – 2019. – Vol. 290. – P. 110916.

117. Therapeutic product based on yerba mate extract and eutectic system by one step ultrasound approach / M. de los Angeles Fernandez [et al.] // *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. – 2023. – Vol. 32. – P. 101008.

118. The effect of water content on lignin solubilization in deep eutectic solvents / Y. Zhang [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2023. – Vol. 374. – P. 121271.

119. Understanding the role of temperature in structural changes of choline chloride/glycols deep eutectic solvents / F. Gabriele [et al.] // *Journal of Molecular Liquids*. – 2023. – Vol. 385. – P. 122332.

120. Research Progress on the Preparation and Action Mechanism of Natural Deep Eutectic Solvents and Their Application in Food / K. Wu [et al.] // *Foods*. – 2022. – Vol. 11. – № 21. – P. 3528.

121. Fiehn, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes / O. Fiehn // *Plant Molecular Biology*. – 2002. – Т. 48. – № 1/2. – С. 155-171.

122. Использование подходов метаболомики в анализе лекарственных растений и фитопрепаратов (обзор)/ А. А. Орлова [и др.] // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2021. – Т. 10. – № 1. – С. 97–105.

123. Tan N., Zhou J., Zhao S. Advances in Structural Elucidation of Glucuronide Oleanane-Type Triterpene Carboxylic Acid 3,28-O-Bisdesmosides (1962—1997) / N. Tan, J. Zhou, S. Zhao // *Phytochemistry*. – 1999. – Vol. 52. – № 2. – P. 153-192.

124. Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis / L. C. Gillet, P. Navarro, S. Tate [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2012. – Vol. 11. – № 6. – P. O111.016717.

125. 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 [et al.] // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – № 8. – P. 3614.

126. Ahmad, V. U. Guaiacin A and B from the Leaves of *Guaiacum officinale* / V. U. Ahmad, S. Perveen, S. Bano // *Planta Medica*. – 1989. – Vol. 55. – № 3. – P. 307-308.

127. Saponins from Roots of *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz., Ciqiu : Structures of Kalopanax-saponins C, D, E and F / C.-J. Shao, R. Kasai, J.-D. Xu, O. Tanaka // *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. – 1989. – Vol. 37. – № 2. – P. 311-314.

128. Kasprzyk, Z. The structure of triterpenic glycosides from the flowers of *Calendula officinalis* L. / Z. Kasprzyk, Z. Wojciechowski // *Phytochemistry*. – 1967. – Vol. 6. – № 1. – P. 69-75.

129. Araliaarumoside: A New Triterpene Glycoside Isolated From the Leaves of *Aralia armata* / P. H. Yen, N. T. Cuc, P. T. T. Huong [et al.] // *Natural Product Communications*. – 2020. – Vol. 15. – № 9. – P. 1-5.

130. Kochetkov, N. K. The structures of aralosides A and B / N. K. Kochetkov, A. J. Khorlin, V. E. Vaskovsky // *Tetrahedron Letters*. – 1962. – Vol. 3. – № 16. – P. 713-716.

131. Four New Saponins from the Root Bark of *Aralia elata* / S. Song, N. Nakamura, C. Ma [et al.] // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2000. – Vol. 48. – № 6. – P. 838-842.

132. Identification and comparison of triterpene saponins in *Aralia elata* leaves and buds by the energy-resolved MS^{All} technique on a liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry / F. Han, J. Liang, B.-Y. Yang [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2021. – Vol. 203. – P. 114176.

133. Development of natural deep eutectic solvent (NADES) based on choline chloride as a green solvent to extract phenolic compound from coffee husk waste / A. Maimulyanti, I. Nurhidayati, B. Mellisani [et al.] // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2023. – Vol. 16. – № 4. – P. 104634.

134. Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction / M. C. Ali, J. Chen, H. Zhang [et al.] // *Talanta*. – 2019. – Vol. 203. – P. 16-22.

135. Natural deep eutectic solvents for the extraction of triterpene saponins from *Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J. Wen / A. A. Petrochenko [et al.] // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – №. 8. – P. 3614.

136. Куркин В. А., Рязанова Т. К., Зулькарняева Л. В. Количественное определение сапонинов в препаратах аралии маньчжурской / В. А. Куркин, Т. К. Рязанова, Л. В. Зулькарняева // *Химия растительного сырья*. – 2017. – №. 3. – С. 163-168.

137. Куркин В. А., Рязанова Т. К. Количественное определение суммы сапонинов в сырье аралии маньчжурской / В. А. Куркин, Т. К. Рязанова // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2018. – Т. 52. – №. 5. – С. 42-45.

138. Ultrasound-Assisted Extraction of Total Saponins from *Aralia taibaiensis*: Process Optimization, Phytochemical Characterization, and Mechanism of α -Glucosidase Inhibition / H. Li, B. Zhai, J. Sun [et al.] // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2022. – Vol. 16. – P. 83-105.

139. Рязанова, Т. К. Вопросы использования стандартных образцов при анализе лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов / Т. К. Рязанова, В. А. Куркин // *Эталоны. Стандартные образцы*. – 2023. – Т. 19. – № 2. С. 47-60.

140. Optimization of ultrasonic and microwave-assisted extraction with natural deep eutectic solvents for enhanced recovery of phenolics and terpenoids from celery leaves / T. P. Vo, T. A. T. Ho, N. M. H. Ha, D. Q. Nguyen // *Biomass Conversion and Biorefinery*. – 2024. – P. 1-15.

141. New Green Biorefinery Strategies to Valorize Bioactive Fractions from *Palmaria palmata* / M. Cokdinleyen [et al.] // *Marine Drugs*. – 2024. – Vol. 22. – № 10. – P. 467.

142. 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. – С. 115-122.

143. Optimizing the microwave-assisted extraction and ultrasonic-assisted processes to acquire flavonoid and phenolic compounds from watermelon rinds using natural deep eutectic solvents / T. P. Vo, M. H. Ha, T. A. T. Ho, N. D. Q. Nguyen // Chemical Engineering Communications. – 2024. – P. 1-16.

144. Quantification of the Group B Soyasaponins by High-Performance Liquid Chromatography / J. Hu [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2002. – Vol. 50. – № 9. – P. 2587–94.

145. Масс-спектрокопия экстрактов корня аралии маньчжурской в среде субкритической воды / С. Н. Борисенко [и др.] // Известия Высших Учебных Заведений. Северо-Кавказский Регион. Серия: Естественные Науки. – 2009. – Т. 4. – № 152. – С. 51–54.

146. Ultrasound Effects on the Degradation Kinetics, Structure, and Antioxidant Activity of Sea Cucumber Fucoidan / X. Guo [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2014. – Vol. 62. – № 5. – P. 1088–1095.

147. Kinetics of Ultrasound-assisted Extraction of Flavonoids and Triterpenes and Structure Characterization of Chinese Northeast Black Bee Propolis / Q. Ding [et al.] // Chiang Mai Journal of Science. – 2019. – Vol. 46. – №1. – P. 72-92.

148. Сравнительный анализ перспективных методов экстрагирования для получения извлечения из семян пажитника сенного / С. С. Белокуров [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Т. 8. – № 3. – С. 49–55.

149. Изучение процесса экстракции изосалипурпоза из цветков бессмертника самаркандского (*Helichrysum maracandicum* Popov ex Kirp.) / Ё. С. Кариева [и др.] // Химия растительного сырья. – 2024. – № 1. – С. 354-361.

150. 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 [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2024. – Vol. 17. – № 3. – P. 355.

151. Ionic liquids-ultrasound based efficient extraction of flavonoid glycosides and triterpenoid saponins from licorice / S. Ji [et al.] // *RSC Advances*. – 2018. – Vol. 8. – № 25. – P. 13989–13996.

152. Шикова, В. А. Кинетика экстракции глицирризиновой кислоты из корней *Glycyrrhiza glabra* L. с использованием природного глубокого эвтектического растворителя / В. А. Шикова, Буракова М. А. // *Материалы VII Дальневосточного медицинского молодежного форума «Актуальные Вопросы Современной Медицины»*. – Хабаровск, 2023. – С. 248-250.

153. Sugar-based natural deep eutectic solvent (NADES): Physicochemical properties, antimicrobial activity, toxicity, biodegradability and potential use as green extraction media for phytonutrients / Q. Q. Koh, Y. L. Kua, S. Gan [et al.] // *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. – 2023. – Vol. 35. – P. 101218.

154. Пономарев В. Д. Экстрагирование лекарственного сырья / В. Д. Пономарев. Москва: Медицина, 1976. – 202 с.

155. A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies / L. Shen, S. Pang, M. Zhong [et al.] // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2023. – Vol. 101. – P. 106646.

156. Ultrasound-assisted extraction with natural deep eutectic solvent for phenolic compounds recovery from *Rosa damascene* Mill.: Experimental design optimization using central composite design / H. Koraqi, A. Y. Aydar, W. Khalid [et al.] // *Microchemical Journal*. – 2024. – Vol. 196. – P. 109585.

157. Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) Extraction Improves Polyphenol Yield and Antioxidant Activity of Wild Thyme (*Thymus serpyllum* L.) Extracts / B. Pavlić, Ž. Mrkonjić, N. Teslić [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – № 5. – P. 1508.

158. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from blueberry leaves using natural deep eutectic solvents (NADES) for the valorization of agrifood wastes / M. Santos-Martín, J. Cubero-Cardoso, R. González-Domínguez [et al.] // *Biomass and Bioenergy*. – 2023. – Vol. 175. – P. 106882.

159. Кинетика экстрагирования диосцина из растительного сырья в виброкавитационном гомогенизаторе / Е. В. Флисюк, С. С. Белокуров, И. А. Наркевич [и др.] // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2020. – Т. 9. – № 2. – С. 77-81.

160. Анализ процесса измельчения в виброкавитационном гомогенизаторе / Е. В. Флисюк, С. С. Белокуров, И. А. Наркевич [и др.] // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2020. – Т. 9. – № 4. – С. 53-58.

161. Characterization of chikusetsusaponin IV and V induced apoptosis in HepG2 cancer cells / T. Zuo, Z. Zhang, P. Jiang [et al.] // *Molecular Biology Reports*. – 2022. – Vol. 49. – № 6. – P. 4247-4255.

162. Protective effects of Araloside C against myocardial ischaemia/reperfusion injury: potential involvement of heat shock protein 90 / M. Wang [et al.] // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2017. – Vol. 21. – № 9. – P. 1870-1880.

163. Araloside C prevents hypoxia/reoxygenation-induced endoplasmic reticulum stress via increasing heat shock protein 90 in H9c2 cardiomyocytes / Y. Du [et al.] // *Frontiers in pharmacology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 180.

164. Araloside C protects H9c2 cardiomyoblasts against oxidative stress via the modulation of mitochondrial function / M. Wang [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2019. – Vol. 117. – P. 109143.

165. Mckerrecher, D. Heteroaryl benzamide derivatives for use as glk activators in the treatment of diabetes / D. Mckerrecher, K. G. Pike, M. J. Waring. – 2006. – URL: <https://patents.google.com/patent/WO2006125972A1/en/und> (дата обращения: 30.04.2024). – Текст : электронный.

166. Xia, P. Two important Ginseng plants in Southeast Asia: a systematic review of their traditional uses, botany, phytochemistry, and pharmacology / P. Xia, Y. Mao, Z. Liang // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2022. – Vol. 44. – № 10. – P. 105.

167. Tang, Y. Review on research of the phytochemistry and pharmacological activities of *Celosia argentea* / Y. Tang, H. Xin, M. Guo // *Revista Brasileira de Farmacognosia*. – 2016. – Vol. 26. – № 6. – P. 787-796.

168. Muley, B. Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (*Asteraceae*): A Review / B. Muley, S. Khadabadi, N. Banarase // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. – 2009. – Vol. 8. – № 5. – P. 455-465.

169. Pharmacoinformatics-based phytochemical screening for anticancer impacts of yellow sweet clover, *Melilotus officinalis* (Linn.) Pall / S. Parvizpour, Y. Masoudi-Sobhanzadeh, M. M. Pourseif [et al.] // *Computers in Biology and Medicine*. – 2021. – Vol. 138. – P. 104921.

170. Nishimura, K. Triterpenoid Saponins from *Ilex kudincha* / K. Nishimura, T. Miyase, H. Noguchi // *Journal of Natural Products*. – 1999. – Vol. 62. – № 8. – P. 1128-1133.

171. Design, synthesis, and biological evaluation of hederagenin derivatives with improved aqueous solubility and tumor resistance reversal activity / B. Wang, S. Liu, W. Huang [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 211. – P. 113107.

172. Effect of the total saponins of *Aralia elata* (Miq) Seem on cardiac contractile function and intracellular calcium cycling regulation / M. Wang [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2014. – Vol. 155. – № 1. – P. 240-247.

173. Protective effects of Araloside C against myocardial ischaemia/reperfusion injury: potential involvement of heat shock protein 90 / M. Wang [et al.] // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2017. – Vol. 21. – № 9. – P. 1870-1880.

174. Protective effect of total aralosides of *Aralia elata* (Miq) Seem (TASAES) against diabetic cardiomyopathy in rats during the early stage, and possible mechanisms / S. Xi [et al.] // *Experimental & molecular medicine*. – 2009. – Vol. 41. – № 8. – P. 538-547.

175. Машковский М. Д. Лекарственные средства. Пособие для врачей. Том 1 / Машковский М. Д. — 14-е изд., перераб., испр., доп. — Москва: ООО «Новая волна», 2002 — 540 с.

176. Current Advances in Naturally Occurring Caffeoylquinic Acids: Structure, Bioactivity, and Synthesis / W. Liu, J. Li, X. Zhang [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2020. – Vol. 68. – № 39. – P. 10489-10516.

177. Chhetri, D. R. Myo-Inositol and Its Derivatives: Their Emerging Role in the Treatment of Human Diseases / D. R. Chhetri // *Frontiers in Pharmacology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1172.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица 1. Характеристика тритерпеновых сапонинов, выделенных из аралии маньчжурской

№	Название	Формула	Молярная масса	m/z
Производные олеаноловой кислоты				
1	Аралозид А (чикусетсусапонин IV, олеанозид Е)	$C_{47}H_{74}O_{18}$	927,0910	925,4875
2	Аралозид А метиловый эфир (чикусетсусапонин IV метиловый эфир)	$C_{48}H_{76}O_{18}$	941,1180	940,5032
3	Аралозид В (олеанозид С)	$C_{52}H_{82}O_{22}$	1059,2060	1058,5298
4	Аралозид С (олеанозид А)	$C_{53}H_{84}O_{23}$	1089,2320	1088,5403
5	Аралозид G	$C_{54}H_{88}O_{23}$	1105,2750	1104,5716
6	Календулозид Е (момордин Ib, полисциасапонин P ₇ , шеффлеразид I, сильфиозид F)	$C_{36}H_{56}O_9$	632,8350	632,3924
7	Сильфиозид А (календулозид F монометиловый эфир, чикусетсапонин IVa метиловый эфир)	$C_{43}H_{68}O_{14}$	809,0030	808,4609
8	Сильфиозид В (ахирантозид II, люцинозид H, люциозид H)	$C_{42}H_{68}O_{13}$	780,9930	780,4660
9	Сильфиозид Е	$C_{48}H_{78}O_{18}$	943,1340	942,5188
10	Конгмунозид V (аралиясапонин V, аралозид V)	$C_{54}H_{88}O_{23}$	1105,2750	1104,5716
11	Конгмунозид X (аралозид X)	$C_{60}H_{98}O_{28}$	1267,4160	1266,6245
12	Конгмунозид XI	$C_{59}H_{94}O_{28}$	1251,3730	1250,5932
13	Конгмунозид XII	$C_{65}H_{106}O_{32}$	1399,5310	1398,6667
14	Конгмунозид XIII	$C_{71}H_{116}O_{37}$	1561,6720	1560,7195
15	Конгмунозид XIV	$C_{57}H_{92}O_{23}$	1145,3400	1144,6029
16	Спинасапонин А (калопанакс сапонин Е)	$C_{42}H_{66}O_{14}$	794,9760	794,4453
17	Спинасапонин А 28-О-гликозид	$C_{48}H_{76}O_{19}$	957,1170	956,4981
18	Элатозид А (тарасапонин II)	$C_{47}H_{74}O_{18}$	927,0910	926,4875
19	Элатозид В	$C_{48}H_{76}O_{19}$	957,1170	956,4981
20	Элатозид С	$C_{53}H_{84}O_{23}$	1089,2320	1088,5403
21	Элатозид D	$C_{54}H_{86}O_{24}$	1119,2580	1118,5509
22	Элатозид Е (тарасапонин III)	$C_{46}H_{74}O_{16}$	883,0820	882,4977
23	Элатозид F (караганозид А, тарасапонин VII)	$C_{52}H_{84}O_{21}$	1045,2230	1044,5505
24	Элатозид I	$C_{48}H_{76}O_{19}$	957,1170	956,4981
25	Элатозид L	$C_{65}H_{104}O_{33}$	1413,5140	1412,6460
26	Стипулеанозид R ₁ (стипулеанозид R1, стипулеанозид Rβ, тарасапонин I)	$C_{47}H_{74}O_{18}$	927,0910	926,4875

27	Стипулеанозид R ₂	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₃	1089,2320	1088,5403
28	Калопанакс сапонин F	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₃	1089,2320	1089,5403
29	Калопанакс сапонин F метиловый эфир	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₃	1103,2590	1102,5560
30	Акутозид А (гедерозид E ₂ , олеаноловая кислота-3-софорозид)	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	780,9930	780,4660
31	Гуаиацин В	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇	913,1080	912,5083
32	Анчузозид 2	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	943,1340	942,5188
33	Рандианин	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	780,9930	780,4660
34	Аралиясапонин IV (<i>Aralia elata</i>)	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₄	1121,2740	1120,5666
35	Аралиясапонин IV (<i>Aralia decaisneana</i>)	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₂	1075,2490	1074,5611
36	Чикусетсусапонин (1)	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	618,8520	618,4132
37	Чикусетсусапонин Ib	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₈	927,0910	926,4875
38	Нарциссифлорин (тарасапонин VI, 28-дегликозилчикусетсусапонин IV)	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃	764,9500	764,4347
39	3-О-{β-D-галактопиранозил-(1→3)[β-D-глюкопиранозил-(1→4)]-β-D-глюкопиранозил} олеаноловая кислота (28→1)-β-D-глюкопиранозильный эфир	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	943,1340	943,5188
40	Тарасапонин I диметиловый эфир	C ₄₉ H ₇₈ O ₁₈	955,1450	954,5188
41	Тарасапонин II диметиловый эфир	C ₄₉ H ₇₈ O ₁₈	955,1450	954,5188
42	Тарасапонин III метиловый эфир (календулагликозид С 6'-О-метиловый эфир)	C ₄₉ H ₇₈ O ₁₉	971,1440	970,5137
43	Тарасапонин IV	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₃	1089,2320	1088,5403
44	Тарасапонин V (элатозид К)	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₃	1089,2320	1088,5403
45	Чикусетсусапонин IV _a	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	794,9760	794,4453
46	Зингиброзид R ₁ (гинсенозид Z-R ₁ полисциасапонин P ₅)	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	794,9760	794,4453
47	Чикусетсусапонин V (гинсенозид R ₀ , полисциасапонин P ₃)	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	957,1170	956,4981
48	Псевдогинсенозид RT ₁	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₈	927,0910	926,4875
49	3-О-[β-D-глюкопиранозил-(1→4)-β-D-глюкуронопиранозил]-олеаноловой кислоты 28-О-β-D-глюкопиранозильный эфир (туберозид А)	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	957,1170	956,4981
50	3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-β-D-глюкопиранозил-олеаноловой кислоты 28-О-β-D-глюкопиранозид (анчузозид А)	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	943,1340	942,5188
51	3-О-[β-D-галактопиранозил-(1→6)-β-D-глюкопиранозил] олеаноловая кислота	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	780,9930	780,4660
52	3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-β-D-глюкопиранозил олеаноловая кислота	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	780,9930	780,4660
53	3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-α-L-арабинопиранозид олеаноловой кислоты (асперосапонин G, пулсатилла сапонин I)	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₆	897,1090	896,5133
54	28-О-β-D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	618,8520	618,4132

Производные гедерагенина				
55	Конгмунозид VII (аралиясапонин VII (<i>Aralia elata</i>), аралозид VII)	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₄	1121,2740	1120,5666
56	Конгмунозид IX (аралия-сапонин IX (<i>Aralia elata</i>))	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₃	1091,2480	1090,5560
57	Конгмуенозид D	C ₆₀ H ₉₈ O ₂₉	1283,4150	1282,6194
58	Конгмуенозид II	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	959,1330	958,5137
59	Конгмуенозид A (элатозид J)	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	959,1330	958,5137
60	Конгмуенозид B	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₄	1121,2740	1120,5666
61	Люцинозид E (люциозид E)	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₄	796,9920	796,4609
62	Коллинсонидин	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	766,9660	766,4503
63	Киноасапонин B	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	929,1070	928,5032
64	Дурупкозид C	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	929,1070	928,5032
65	α-гедерин (гедерозид C, калопанакс сапонин A)	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂	750,9670	750,4554
66	3-О-[β-D-глюкопиранозил-(1→2)-[β-D-глюкопиранозил-(1→3)]-α-L-арабинопиранозил гедерагенин	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	929,1070	928,5032
67	3-О-[β-D-глюкопиранозил-(1→2)-β-D-глюкопиранозил] гедерагенин (гедерозид F)	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₄	796,9920	796,4609
68	3-О-[β-D-глюкопиранозил-(1→3)-β-D-глюкопиранозил] гедерагенина 28-О-β-D-глюкопиранозиловый эфир	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	959,1330	958,5137
69	Гедерагенина 3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-α-L-арабинопиранозид (калопанаксапонин H)	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇	913,1080	912,5083
70	3-О-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-α-L-арабинопиранозил гедерагенина 28-О-β-D-ксилопиранозил-(1→6)-β-D-глюкопиранозиловый эфир	C ₅₂ H ₈₄ O ₂₁	1045,2230	1044,5505
71	3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-α-L-арабинопиранозил гедерагенина 28-О-β-D-глюкопиранозил-(1→6)-β-D-глюкопиранозиловый эфир	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₇	1237,3900	1236,6139
Производные эхиноцистовой кислоты				
72	Конгмунозид I (аралиясапонин I)	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	929,1070	928,5032
73	Конгмунозид III (аралиясапонин III)	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₃	1091,2480	1090,5560
74	Конгмунозид IV	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₄	1121,2740	1120,5666
75	Конгмунозид XV	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₄	1121,2740	1120,5666
76	Конгмуянозид B	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	959,1330	958,5137
77	Конгмуянозид C	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₄	796,9920	796,4609
78	Конгмуянозид D	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₄	796,9920	796,4609
79	Конгмуенозид I (1)	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	959,1330	958,5137
80	Конгмуенозид III (Конгмуенозид E)	C ₆₀ H ₉₈ O ₂₉	1283,4150	1282,6194
81	Элатозид H	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₅	810,9750	810,4402
82	Экклалбасапонин I (экклалбасапонин C)	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₄	796,9920	796,4609

83	Гликозид St-B (гликозид L-B ₁)	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	604,8250	604,3975
84	Аралия-сапонин I (<i>Aralia elata</i>)	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	929,1070	928,5032
85	Аралия-сапонин III (<i>Aralia elata</i>)	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₃	1091,2480	1090,5560
86	Аралия-сапонин VI (<i>Aralia elata</i>)	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₄	1121,2740	1120,5666
87	3-О-[β-D-глюкопиранозил(1 → 3)- α-L-арабинопиранозил]-эхиноцистовая кислота (гликозид St-D ₁)	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	766,9660	766,4503
88	6'-О-Бутиловый эфир эхиноцистовой кислоты-3-О-β-D-глюкопиранозил-(1-3)-β-D- глюкуронопиранозид	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₅	867,0830	866,5028
89	3-О-β-D-глюкопиранозил-(1 → 3)-β-D-глюкопиранозил-(1 → 3)-β-D-глюкопиранозил эхиноцистовая кислота	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	959,1330	958,5137
Производные каулофиллогенина				
90	Конгмунозид II (аралиясапонин II (<i>Aralia elata</i>))	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₉	945,1060	944,4981
91	Конгмунозид VIII (аралиясапонин VIII (<i>Aralia elata</i>))	C ₆₀ H ₉₈ O ₃₀	1299,4140	1298,6143
92	Конгмуянозид I	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₅	812,9910	810,4558
93	Конгмуянозид А	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₄	782,9650	782,4453
94	Конгмуянозид Е	C ₄₈ H ₇₈ O ₂₀	975,1320	974,5086
95	Глюкокаулофиллогенин	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	650,8500	650,4030
96	Конгмуенозид IV	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₅	812,9910	810,4558
97	Конгмуенозид С	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₅	1137,2730	1136,5615
98	Элатозид G	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₁	664,8330	664,3823

Таблица 2. Структура-активность тритерпеновых сапонинов, выделенных из аралии маньчжурской

№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
1	Аралозид А (чикусетсусапонин IV, олеанозид Е)	7518-22-1	<i>in vitro</i>	Ингибитор α -глюкозидазы	Лечение сахарного диабета	10.1002/jssc.201500064
				Снижение содержания триглицеридов и таурохолевой кислоты в гепатоцитах без цитотоксичности	Гиполипидемические препараты	10.1016/j.jep.2021.114671
				Противоопухолевая активность	Противоопухолевые препараты	10.1007/s11033-022-07259-7
			<i>in vivo</i>	Снижение поражения желудка и образования язв (гастропротективная активность)	Лечение язвенной болезни желудка	10.1248/bpb.28.523 10.1007/s11418-018-1256-0
Ингибирование опорожнения желудка	Лечение диабета и патологического ожирения	10.1016/S0968-0896(98)00207-7				
2	Аралозид А метиловый эфир (чикусетсусапонин IV метиловый эфир)	25694-41-1	<i>in vitro</i>	Умеренная цитотоксичность в отношении клеток HL-60	Противоопухолевые препараты	10.1016/j.bmcl.2010.09.074
3	Аралозид В (олеанозид С)	7518-23-2	<i>in vivo</i>	Тонизирующее, нейротропное действие	Лечение астенических состояний	Связь между химической структурой и нейротропным действием гликозидов олеаноловой кислоты К. Соколов, С.Я. Зинкевич (1972)
4	Аралозид С (олеанозид А)	55446-15-6	<i>in vitro</i>	Защита кардиомиоцитов от гибели, вызываемое гипоксией/реоксигенацией	Лечение заболеваний сердца	10.1111/jcmm.13107 10.3389/fphar.2018.00180
				Защита кардиомиоцитов от окислительного стресса		10.1016/j.biopha.2019.109143
5	Аралозид G	144077-05-4	не изучалась			
6	Календулозид Е (момордин Ib, полисциасапонин P ₇ , шеффлеразид I, сильфиозид F)	26020-14-4	<i>in vitro</i>	Ингибитор α -глюкозидазы	Лечение сахарного диабета	10.1080/10286020.2015.1121999
				Цитотоксическая активность в отношении клеточных линий рака молочной железы человека MCF-7	Лечение новообразований молочных желез	10.1080/10286020.2015.1121999
				Индукция апоптоза в клеточных линиях рака Ингибирование ДНК-топоизомеразы 1 и 2	Лечение новообразований молочных желез	10.1039/C5MD00502G
				Ингибитор гиалуронидазы	Лечение остеоартрита	10.3390/molecules28030982

№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
				Ингибитор липазы поджелудочной железы	Лечение ожирения	10.1248/cpb.55.1087
				Антибактериальная и противогрибковая активность	Лечение инфекционных заболеваний	10.1186/s13065-018-0466-6
			<i>in vivo</i>	Снижение поражения желудка и образования язв	Лечение язвенной болезни желудка	10.1248/bpb.28.523
			<i>in vivo</i>	Подавление роста опухоли, антиангиогенная активность	Противоопухолевые препараты	10.3390/molecules24162985
7	Сильфиозид А (календулозид F монометиловый эфир, чикусетсапонин IVa метиловый эфир)	58546-61-5	<i>in vitro</i>	Ингибитор α -глюкозидазы	Лечение новообразований молочной железы	10.1080/10286020.2015.1121999
				Ингибирование генерации супероксид-аниона (провоспалительное действие нейтрофилов)	Противовоспалительное средства	10.1021/np100851s
				Ингибитор Wnt/ β -катенина	Лечение колоректального рака	10.1016/j.bbrc.2015.02.152
			<i>in vivo</i>	Ингибирующий эффект на продукцию простагландина E ₂	Противовоспалительное средства	10.1007/s12272-015-0654-z
			<i>in vivo</i>	Индукцированное ангиотензином II ингибирование пролиферации	Лечение заболеваний сердечно-сосудистой системы	10.1021/acs.jnatprod.6b00748
8	Сильфиозид В (ахирантозид II, люцинозид H, люциозид H)	78454-20-3	<i>in vitro</i>	Антимикробное действие	Лечение инфекционных заболеваний	10.1016/j.phytochem.2017.08.015
9	Сильфиозид E	90452-93-0	<i>in vitro</i>	Ингибитор, модулирующий активацию комплемента	Лечение заболеваний, вызванных чрезмерной активацией комплемента	10.1007/bf02979071
			<i>in vivo</i>	Гипохолестеринемический, гипотриглицеридемический эффекты	Гиполипидемические препараты	Сыров В.Н., Хушбакова З.А., Давидянц Э.С. Тритерпеноидные гликозиды из <i>Silphium perfoliatum</i> L. Гиполипидемическая активность сильфиозидов. Химико-фармацевтический журнал, 1992, №7, 66-69
10	Конгмунозид V (аралиясапонин V, аралозид V)	340963-86-2	<i>in vivo</i>	Антиоксидантная и антидиабетическая активность	Лечение сахарного диабета	10.1016/j.fitote.2011.11.002
			<i>in vitro</i>	Подавление образования супероксидных анионов в нейтрофилах	Лечение воспалительных заболеваний - ревматоидного артрита и острого респираторного дистресс-синдрома	10.1016/j.abb.2005.11.006

№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
			<i>in vitro</i>	Ингибирующее воздействие на α -глюкозидазу	Лечение сахарного диабета	10.1016/j.phytol.2018.06.002
11	Конгмунозид X (аралозид X)	344911-90-6	<i>in vitro</i>	Нейропротекторная активность	Облегчение симптомов нейродегенеративных заболеваний	10.1016/j.biopha.2017.10.106
			<i>in vitro</i>	Подавление образования супероксидных анионов в нейтрофилах	Лечение воспалительных заболеваний - ревматоидного артрита и острого респираторного дистресс-синдрома	10.1016/j.abb.2005.11.006
12	Конгмунозид XI	344911-91-7	<i>in vitro</i>	Подавление образования супероксидных анионов в нейтрофилах человека	Лечение воспалительных заболеваний - ревматоидного артрита и острого респираторного дистресс-синдрома	10.1016/j.abb.2005.11.006
13	Конгмунозид XII	329969-11-1	<i>in vitro</i>	Подавление образования супероксидных анионов в нейтрофилах человека	Лечение воспалительных заболеваний - ревматоидного артрита и острого респираторного дистресс-синдрома	10.1016/j.abb.2005.11.006
14	Конгмунозид XIII	329969-12-2			не изучалась	
15	Конгмунозид XIV	329969-14-4			не изучалась	
16	Спинасапонин А (калопанакс сапонин Е)	25406-56-8	<i>in vitro</i>	Стимулирующая активность в отношении биосинтеза меланина и нейропротективный эффект при токсичности, индуцированной H_2O_2	Противоопухолевые препараты	10.1002/ptr.5589
			<i>in vivo</i>	Ингибирующее действие на абсорбцию этанола	Снижение токсичности этанола	10.1248/cpb.44.1915
17	Спинасапонин А 28-О-гликозид	107241-05-4	<i>in vitro</i>	Стимулирующий эффект на выработку гиалуроновой кислоты на нормальных дермальных фибробластах человека взрослого человека (NHDF-Ad)	Офтальмология, лечение болезней суставов, заживление ран, эндопротезирование синовиальной жидкости, косметическая хирургия	10.1002/ptr.5589
18	Элатозид А (тарасапонин II)	155836-04-7	<i>in vitro</i>	Антипролиферативная активность	Противоопухолевые препараты	10.1080/14786419.2019.1666383
			<i>in vivo</i>	Ингибирующее действие на абсорбцию этанола	Снижение токсичности этанола	10.1248/cpb.44.1915
19	Элатозид В	156856-38-1	<i>in vivo</i>	Ингибирующее действие на абсорбцию этанола	Снижение токсичности этанола	10.1248/cpb.44.1915

№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
20	Элатозид С	156856-39-2	<i>in vitro</i>	Ослабление повреждения эпителиальных клеток сосудов, вызываемое окисленным липопротеином низкой плотности	Лечение атеросклероза	10.1016/j.bbadis.2017.01.017
				Защита кардиомиоцитов от гибели, вызываемое гипоксией/реоксигенацией	Лечение заболеваний сердца	10.1007/s10495-014-1039-3
21	Элатозид D	156856-40-5	<i>in vitro</i>	Увеличение трансактивации PPAR	Профилактика воспалительных заболеваний	10.1016/j.bmcl.2011.08.024
22	Элатозид E (тарасапонин III)	156980-30-2	<i>in vitro</i>	Противоопухолевая активность	Противоопухолевые препараты	10.1016/j.carres.2017.08.010
23	Элатозид F (караганозид A, тарасапонин VII)	144118-18-3	<i>in vitro</i>	Противоопухолевая активность	Противоопухолевые препараты	10.1016/j.carres.2017.08.010
24	Элатозид I	52657-00-8	<i>in vitro</i>	Ингибитор α -глюкозидазы, α -амилазы	Лечение сахарного диабета	10.1691/ph.2013.2753
25	Элатозид L	1339043-02-5	<i>in vitro</i>	Ингибирующее действие на NF- κ B, подавление активности синтазы оксида азота, циклооксигеназы-2	Противовоспалительные препараты	10.1016/j.bmcl.2011.08.024
26	Стипулеанозид R ₁ (стипулеанозид R1, стипулеанозид R β , тарасапонин I)	96627-79-1	<i>in vitro</i>	Цитотоксическая активность в отношении линий клеток HT29 и A549	Противоопухолевые препараты	10.1080/14786419.2020.1768090
			<i>in vivo</i>	Ингибирующее действие на абсорбцию этанола	Снижение токсичности этанола	10.1248/cpb.44.1915
27	Стипулеанозид R ₂	96627-72-4	<i>in vivo</i>	Антиоксидантная и антидиабетическая активность	Лечение сахарного диабета	10.1016/j.fitote.2011.11.002
28	Калопанакс сапонин F	121521-91-3	<i>in vitro</i>	Ингибирующее действие на NF- κ B, подавление активности синтазы оксида азота, циклооксигеназы-2	Противовоспалительные препараты	10.1016/j.bmcl.2011.08.024
29	Калопанакс сапонин F метиловый эфир	131542-51-3	<i>in vitro</i>	Увеличение трансактивации PPAR	Противовоспалительные препараты	10.1016/j.bmcl.2011.08.024
30	Акутозид A (гедерозид E ₂ , олеаноловая кислота-3-софорозид)	58231-99-5	<i>in vitro</i>	Слабая антимикробная и противоопухолевая активность	-	10.1021/np0000926
			<i>in vitro</i>	Нейропротекторная активность	Облегчение симптомов нейродегенеративных заболеваний	10.1016/j.biopha.2017.10.106
31	Гуаиацин B	101021-02-7	<i>in vitro</i>	Отсутствие цитотоксического эффекта на клетки лейкемии человека HL-60	-	10.1016/j.phytochem.2010.09.012
32	Анчюзозид 2	72843-50-6	<i>in vitro</i>	Слабая антимикробная и противоопухолевая активность	-	10.1021/np0000926

№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
33	Рандианин	72786-31-3	<i>in vitro</i>	Противогрибковая активность в сочетании с флуконазолом	Лечение грибковых заболеваний	10.1016/j.carres.2022.108575
34	Аралиясапонин IV (<i>Aralia elata</i>)	289649-67-8	<i>in vitro</i>	Ингибирующее воздействие на α -глюкозидазу	Лечение сахарного диабета	10.1016/j.phytol.2018.06.002
35	Аралиясапонин IV (<i>Aralia decaisneana</i>)	175556-03-3	<i>in vitro</i>	Отсутствие активности в отношении клеток эпидермоидной карциномы, карциномы шейки матки	-	10.1080/14786419.2017.1385009
36	Чикусетсусапонин (1)	14162-53-9	<i>in vitro</i>	Умеренная цитотоксическая активность в отношении клеточной линии мышинового лимфоцитарного лейкоза L1210, миелолейкоза человека K562, карциномы Льюиса легкого мышей	Противоопухолевые препараты	10.1007/BF02969263
			<i>in vitro</i>	Ингибитор циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1)	Лечение воспалительных заболеваний	10.1007/BF02969263
			<i>in vitro</i>	Ингибирующее воздействие на α -глюкозидазу и α -амилазу	Лечение сахарного диабета	10.1002/ardp.201500179
			<i>in vitro</i>	Ингибирующее воздействие на α -глюкозидазу	Лечение сахарного диабета	http://dx.doi.org/10.13005/ojc/360207
			<i>in vivo</i>	Ингибитор гликогенфосфорилазы А	Лечение сахарного диабета	10.1021/np100851s
			<i>in vivo</i>	Ингибитор прокоагулянтной активности тканевого фактора	Лечение заболеваний, связанных с тканевым фактором (рак, сердечно-сосудистые заболевания)	10.1021/jm8000949
			<i>in vitro</i>	Цитотоксический эффект в отношении клеточных линий рака HT29, A2058, A549	Противоопухолевые препараты	10.1016/j.bmcl.2016.12.066
			<i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	Снижение токсичности метилртути	Лечение отравлений метилртутью	10.1080/14786419.2020.1768090
37	Чикусетсусапонин Ib	59252-87-8	<i>in vitro</i>	Ингибирующая активность в отношении PAI-1 (ингибитора активации плазминогена 1 типа)	Тромбоз глубоких вен, ишемическая болезнь сердца и фиброз легких	Patent Espacenet CN103739651A
			<i>in vitro</i>	Ингибиторы ацетилхолинэстеразы	Лечение болезни Альцгеймера	10.1016/j.jchromb.2017.07.019
38	Нарциссифлорин (тарасапонин VI, 28-	59252-95-8	<i>in vivo</i>	Гипогликемическая активность за счет ингибирования опорожнения желудка	Профилактика и лечение диабета	10.1016/S0968-0896(98)00207-7

№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
	дегликозилчикусетсусапонин IV)		<i>in vitro</i>	Цитотоксическая активность в отношении линий клеток HT29 и A549	Противоопухолевые препараты	10.1080/14786419.2020.1768090
39	3- <i>O</i> -{ β - <i>D</i> -галактопиранозил-(1→3)[β - <i>D</i> -глюкопиранозил-(1→4)]- β - <i>D</i> -глюкопиранозил} олеаноловая кислота (28→1)- β - <i>D</i> -глюкопиранозильный эфир	53043-29-1	<i>in vitro</i>	Ингибирующее действие на вирус везикулярного стоматита и риновирус	Противовирусные препараты	10.1055/s-2006-960084
40	Тарасапонин I диметильный эфир	155740-12-8	не изучалась			
41	Тарасапонин II диметильный эфир	155740-13-9	не изучалась			
42	Тарасапонин III метильный эфир (календулагликозид С 6'- <i>O</i> -метильный эфир)	155740-14-0	<i>in vivo</i>	Уменьшение воспаления, вызванное форболовым эфиром. Ингибитор раннего антигена вируса Эпштейна-Барра, индуцированного с помощью форболового эфира.	Противоопухолевые препараты	10.1021/np068016b
43	Тарасапонин IV	156980-31-3	<i>in vitro</i>	Стимулирование первичной пролиферации и минерализации остеобластов	Профилактика и лечение заболеваний костей	Patent Espacenet CN108685930A
			<i>in vivo</i>	Антиоксидантная и антидиабетическая активность	Лечение сахарного диабета	10.1016/j.fitote.2011.11.002
44	Тарасапонин V (элатозид К)	91204-06-7	<i>in vivo</i>	Антиоксидантная и антидиабетическая активность	Лечение сахарного диабета	10.1179/174329210x12650506623041
			<i>in vitro</i>	Подавление образования супероксидных анионов в нейтрофилах человека	Лечение воспалительных заболеваний	10.1016/s0009-8981(03)00326-7
			<i>in vitro</i>	Стимулирование секреции инсулина клетками мышечной инсулиномы β ТСЗ	Лечение сахарного диабета	10.1016/j.lfs.2012.11.014
			<i>in vitro</i>	Ингибитор α -глюкозидазы, α -амилазы	Лечение сахарного диабета	10.1691/ph.2013.2753
			<i>in vitro</i>	Ингибитор циклической АМФ фосфодиэстеразы	Лечение заболеваний сердечно-сосудистой системы	10.1248/cpb.32.1477
45	Чикусетсусапонин IV _a	51415-02-2	<i>in vivo</i>	Ингибирующее действие на абсорбцию этанола	Снижение токсичности этанола	10.1248/cpb.41.2069
			<i>in vivo</i>	Подавление роста опухоли, антиангиогенная активность	Противоопухолевые препараты	10.3390/molecules24162985

№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
			<i>in vitro</i>	Ингибитор α -глюкозидазы	Лечение сахарного диабета	10.1002/jssc.201500064
			<i>in vitro</i>	Ингибитор пролиферации раковых клеток простаты	Лечение рака предстательной железы	10.1016/j.biopha.2017.03.050
			<i>in vitro</i>	Подавление образования супероксидных анионов и высвобождения эластазы в нейтрофилах человека	Лечение воспалительных заболеваний	10.1021/np100851s
			<i>in vitro</i>	Ингибитор дифференцирования адипоцитов	Лечение ожирения	10.3390/nu10091221
			<i>in vivo</i>	Защита мозга от последствий ишемии при диабете	Лечение ишемического инсульта при сахарном диабете	10.1007/s12035-014-9033-x
			<i>in vivo</i>	Нейропротективная активность	Лечение послеоперационной когнитивной дисфункции	10.1007/s43440-020-00078-2
			<i>in vivo</i>	Противовоспалительная и остеопротекторная активность	Лечение ревматоидного артрита	10.1016/j.phymed.2021.153801
			<i>in vivo</i>	Снижение уровня глюкозы в крови, триглицеридов, свободных жирных кислот и липопротеидов низкой плотности	Лечение сахарного диабета и других метаболических нарушений	10.1111/jphp.12392
			<i>in vitro</i>	Цитотоксический эффект в отношении клеток гепатоцеллюлярной карциномы HepG2	Противоопухолевые препараты	10.3892/mmr.2015.4035
46	Зингибродид R ₁ (гинсенозид Z-R ₁ полисциасапонин P ₅)	80930-74-1	<i>in vivo</i>	Подавление роста опухоли, антиангиогенная активность	Противоопухолевые препараты	10.3390/molecules24162985
47	Чикусетсусапонин V (гинсенозид R ₀ , полисциасапонин P ₃)	34367-04-9	<i>in vivo</i>	Подавление роста опухоли, антиангиогенная активность	Противоопухолевые препараты	10.3390/molecules24162985
			<i>in vitro</i>	Ингибитор α -глюкозидазы	Лечение сахарного диабета	10.1002/jssc.201500064
			<i>in vitro</i>	Ингибирование агрегации β -амилоида	Лечение болезни Альцгеймера	10.1016/j.bmc.2017.04.023
			<i>in vitro</i>	Ингибиторы дипептидилпептидазы-4	Лечение сахарного диабета	10.1016/j.ejphar.2020.173272
			<i>in vivo</i>	Уменьшение ожирения и инсулинорезистентности за счет активации G-белок-связанных мембранных рецепторов желчных кислот (TGR5)	Лечение ожирения и метаболических заболеваний	10.1124/jpet.120.000435

№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
			<i>in vivo</i>	Противовоспалительное действие при остром поражении печени	Лечение заболеваний печени	10.3109/08923973.2016.1153109
			<i>in vitro</i>	Ингибирование слияния аутофагосомы и лизосомы	Противоопухолевые препараты	10.1080/15548627.2016.1192751
			<i>in vitro</i>	Цитотоксическое действие на клетки линии рака человека HepG2	Противоопухолевые препараты	10.1007/s11033-022-07259-7
			<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Уменьшение повреждения мозга при ишемии/реперфузии	Лечение ишемического инсульта	10.1016/j.phymed.2021.153516
			<i>in vivo</i>	Ослабление повреждения при остром воспалении легких	Лечение легочного воспаления	10.1016/j.intimp.2019.02.023
			<i>in vivo</i>	Снижение выработки фактора некроза опухоли (TNF- α)	Лечение саркопении, хронической боли, деменции	10.1016/j.gene.2021.146178
48	Псевдогинсенозид RT ₁	98474-74-9	<i>in vitro</i>	Ингибирующее действие на образование супероксид-анионов, индуцируемых формил-L-метионил-L-лейцил-фенилаланин/цитохалазином B, и высвобождение эластазы в нейтрофилах человека	Противовоспалительные средства	10.1021/np100851s
49	3-O-[β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)- β -D-глюкуронопиранозил]-олеаноловой кислоты 28-O- β -D-глюкопиранозильный эфир (туберозид A)	178894-82-1	<i>in vitro</i>	Ингибирование активности α -амилазы и α -глюкозидазы Синергетический ингибирующий эффект на α -амилазу при сочетании с акарбозой	Профилактика и лечение диабета и его осложнений	10.1155/2016/2082946
50	3-O- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 3)- β -D-глюкопиранозил-олеаноловой кислоты 28-O- β -D-глюкопиранозид (анчюзозид 7)	72811-81-5	<i>in vitro</i>	Антикомплементарная активность	Лечение заболеваний, связанных с чрезмерной активацией комплемента	10.1007/bf02979071
51	3-O-[β -D-галактопиранозил(1 \rightarrow 6)- β -D-глюкопиранозил]олеаноловая кислота	288628-20-6	<i>in vitro</i>	Гемолитическая активность	-	10.1007/s007060070055

№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
52	3-О-β-D-глюкопиранозил(1 → 4)-β-D-глюкопиранозил олеаноловая кислота	60299-42-5	<i>in vitro</i>	Ингибирующее воздействие на α-глюкозидазу и α-амилазу	Лечение сахарного диабета	10.1002/ardp.201500179
53	3-О-β-D-глюкопиранозил (1 → 3)-α-L-рамнопиранозил(1 → 2)-α-L-арабинопиранозид олеаноловой кислоты (асперосапонин G, пулсатилла сапонин I)	103956-33-8	<i>in vitro</i>	Ингибитор сахаразы	Лечение сахарного диабета	10.1007/s12272-014-0384-7
			<i>in vitro</i>	Антипролиферативная активность в отношении клеточных линий рака SMMC-7721, Bel-7402, A-549	Противоопухолевые препараты	10.1016/j.carres.2017.02.010
54	28-О-β-D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты	14162-53-9	<i>in vitro</i>	Ингибирующая активность в отношении α-глюкозидазы	Лечение сахарного диабета	10.13005/ojc/360207
			<i>in vitro</i>	Ингибирующее действие на образование супероксид-анионов, индуцируемых формил-L-метионил-L-лейцил-фенилаланин/цитохалазином В, и высвобождение эластазы в нейтрофилах человека	Противовоспалительные средства	10.1021/np100851s
			<i>in vivo</i>	Ингибитор гликогенфосфорилазы А	Лечение сахарного диабета	10.1021/jm8000949
			<i>in vitro</i>	Ингибитор прокоагулянтной активности тканевого фактора	Лечение заболеваний, связанных с тканевым фактором (рак, сердечно-сосудистые заболевания)	10.1016/j.bmcl.2016.12.066
			<i>in vitro</i>	Ингибирующее действие на активатор плазминогена урокиназного типа	Противоопухолевые препараты	10.1016/j.jpba.2018.10.036
			<i>in vivo</i>	Ингибирование опорожнения желудка	Лечение диабета и патологического ожирения	10.1016/S0968-0896(98)00207-7
			<i>in vitro</i>	Умеренная противомикробная активность в отношении <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i>	Лечение инфекционных заболеваний	10.1248/cpb.57.1119
			<i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	Снижение токсичности метилртути	Лечение отравлений метилртутью	10.1016/j.tox.2019.02.006
55	Конгмунозид VII (аралиясапонин VII (<i>Aralia elata</i>), аралозид VII)	340982-22-1		не изучалась		

№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
56	Конгмунозид IX (аралиясапонин IX (<i>Aralia elata</i>))	340982-24-3			не изучалась	
57	Конгмунозид D	1422176-48-4	<i>in vitro</i>	Нейропротекторная активность	Облегчение симптомов нейродегенеративных заболеваний	10.1016/j.biopha.2017.10.106
58	Конгмунозид II	1417579-27-1	<i>in vitro</i>	Цитотоксическая активность в отношении клеточных линий рака HerG2, MCF-7 и A-549	Противоопухолевые препараты	10.1080/14786419.2017.1408092
59	Конгмунозид А (элатозид J)	171828-79-8	<i>in vitro</i>	Нейропротекторное действие на повреждение клеток дофаминергической нейробластомы человека индуцированное пероксидом водорода	Нейропротекторные антиоксиданты	10.1016/j.jff.2018.04.026
60	Конгмунозид В	184427-82-5	<i>in vitro</i>	Нейропротекторная активность	Облегчение симптомов нейродегенеративных заболеваний	10.1016/j.biopha.2017.10.106
61	Люцинозид Е (люциозид Е)	91174-22-0	<i>in vitro</i>	Умеренный нейропротекторный эффект	Облегчение симптомов нейродегенеративных заболеваний	10.1080/14786419.2024.2352141
			<i>in vitro</i>	Ингибирующее воздействие на α -глюкозидазу	Лечение сахарного диабета	10.1002/hlca.201200128
			<i>in vitro</i>	Отсутствие ингибирующего действия на клеточные линии HerG2, MCF-7 и A-549	-	10.1080/14786419.2017.1408092
62	Коллинсонидин	116107-25-6	<i>in vitro</i>	Ингибирующее действие на фибриллогенез, индуцированный β -амилоидом	Лечение болезни Альцгеймера	10.1007/s12272-016-0885-7
63	Киноасапонин В	116107-21-2	<i>in vitro</i>	Гемолитическая активность	-	10.1021/jf0013499
			<i>in vitro</i>	Дозозависимое снижение выработки медиаторов воспаления NO, ингибирование высвобождения воспалительных цитокинов, включая фактор некроза опухоли- α и интерлейкин-6, в клетках, индуцированных липополисахаридами RAW264.7	Противовоспалительные средства	10.1111/1750-3841.12425
64	Дурупкозид С	864165-46-8			не изучалась	
65	α -гедерин (гедерозид С, калопанакс сапонин А)	27013-91-8	<i>in vitro</i>	Запуск апоптоза в клетках колоректального рака HCT116 и HCT8	Противоопухолевые препараты	10.3892/ijo.2019.4757

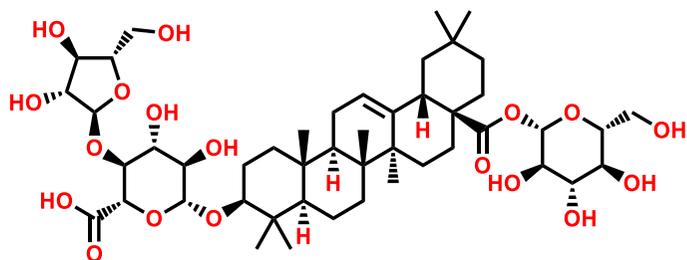
№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
			<i>in vitro</i>	Снижение активности метаболизма глюкозы и замедление пролиферации, повышая экспрессию SNX10 в клетках эндотелия	Противоопухолевые препараты	10.1016/j.phymed.2023.154677
			<i>in vitro</i>	Противогрибковая активность в отношении <i>Candida albicans</i> и <i>Trichophyton rubrum</i>	Противогрибковые препараты	10.1016/j.phytochem.2017.12.004
			<i>in vivo</i>	Снижение уровня глюкозы в сыворотке крови	Лечение сахарного диабета	10.2174/092986713805219082
			<i>in vivo</i>	Подавление активности внутриклеточных амастигот лейшмании	Противопротозойные препараты	10.2174/092986706778201611
			<i>in vitro</i>	Антипролиферативная активность в отношении моноцитов человека	Противоопухолевые препараты	
			<i>in vitro</i>	Отсутствие цитотоксичности, апоптоза раковых клеток человека A549, HEP-2, HT-29 и MIA PaCa-2 при применении с тимохиноном	-	Rooney, Sara; Anticancer Research (2005), 25(3B), 2199-2204
66	3-О-[β-D-глюкопиранозил-(1→2)-[β-D-глюкопиранозил-(1→3)]-α-L-арабинопиранозил гедерагенин	188296-52-8	не изучалась			
67	3-О-[β-D-глюкопиранозил-(1→2)-β-D-глюкопиранозил] гедерагенин (гедерозид F)	73907-85-4	<i>in vitro</i>	Ингибирующее действие на образование супероксид-анионов, индуцируемых формил-L-метионил-L-лейцил-фенилаланин/цитохалазином В, и высвобождение эластазы в нейтрофилах человека	Противовоспалительные средства	10.1055/s-2006-951679
68	3-О-[β-D-глюкопиранозил-(1→3)-β-D-глюкопиранозил] гедерагенина 28-О-β-D-глюкопиранозильный эфир	885042-66-0	не изучалась			
69	Гедерагенина 3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→3)-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-α-L-	128730-82-5	<i>in vitro</i>	Отсутствие цитотоксичности в отношении клеточной линии	-	10.1021/np9901837

№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
	арабинопиранозид (калопанаксапонин Н)					
70	3-О-α-L-рамнопиранозил-(1 → 2)-α-L-арабинопиранозил гедерагенина 28-О-β-D-ксилопиранозил-(1 → 6)-β-D-глюкопиранозильный эфир	128717-92-0	-	Цитопротекторное действие при повреждении печени тетрахлолорметаном	Лечение отравлений тетрахлолорметаном	10.1248/cpb.41.1395
			<i>in vivo</i>	Понижение уровня триглицеридов, общего холестерина и ЛПНП	Лечение ожирения	Patent Number CN109646446A
			<i>in vivo</i>	Повышение уровня монооксида азота (NO)	Лечение эректильной дисфункции	Patent Number KR20160120941A
			<i>in vivo</i>	Защитное действие при глобальной ишемии головного мозга и фокальной ишемии головного мозга	Лечение и профилактика инсульта	Patent Number CN107875157A
			<i>in vivo</i>	Улучшение характеристик костной ткани у крыс с моделью остеопороза	Лечение и профилактика остеопороза	Patent Number CN107865876A
			<i>in vivo</i>	Антибактериальное действие против <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	Лечение инфекционных заболеваний	Patent Number CN107661340A
			<i>in vivo</i>	Защитное действие при инфицировании вирусами RSV, HSV-I и CVB3	Противовирусные препараты	Patent Number CN107595906A
			<i>in vivo</i>	Противовоспалительное и антиокислительное действие	Противовоспалительные и антиокислительные препараты	Patent Number CN107648291A
			<i>in vivo</i>	Улучшение баланса TXA2 и PGI2, подавление агрегации тромбоцитов, защитное действие на миокард	Лечение ишемической болезни сердца	Patent Number CN107875156A
71	3-О-β-D-глюкопиранозил-(1 → 3)-α-L-рамнопиранозил-(1 → 2)-α-L-арабинопиранозил гедерагенина 28-О-β-D-глюкопиранозил-(1 → 6)-β-D-глюкопиранозильный эфир	140360-29-8	<i>in vitro</i>	Высокая противоопухолевая активность в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7	Противоопухолевые препараты	10.2174/1389201019666180226 145427
72	Конгмунозид I (аралиясапонин I)	289649-54-3			не изучалась	
73	Конгмунозид III (аралиясапонин III)	289649-66-7			не изучалась	
74	Конгмунозид IV	1661043-80-6			не изучалась	

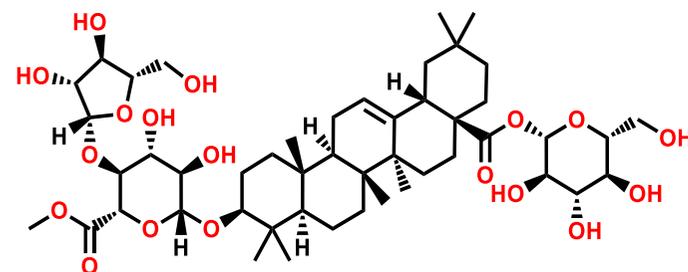
№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
75	Конгмунозид XV	374807-02-0	<i>in vitro</i>	Подавление образования супероксидных анионов в нейтрофилах	Лечение воспалительных заболеваний - ревматоидного артрита и острого респираторного дистресс-синдрома	10.1016/j.abb.2005.11.006
76	Конгмуянозид B	894788-66-0		не изучалась		
77	Конгмуянозид C	876407-08-8	<i>in vitro</i>	Ингибирующее действие на образование супероксид-анионов, индуцируемых формил-L-метионил-L-лейцил-фенилаланин/цитохалазином B, и высвобождение эластазы в нейтрофилах человека	Противовоспалительные средства	10.1055/s-2006-951679
78	Конгмуянозид D	943549-18-6	<i>in vitro</i>	Ингибирующее действие на образование супероксид-анионов, индуцируемых формил-L-метионил-L-лейцил-фенилаланин/цитохалазином B, и высвобождение эластазы в нейтрофилах человека	Противовоспалительные средства	10.1055/s-2006-951679
			<i>in vitro</i>	Умеренная цитотоксическая активность в отношении клеточных линий HL-60, A549, DU145	Противоопухолевые препараты	10.1016/j.foodchem.2012.10.041
79	Конгмуенозид I (1)	1417579-26-0	<i>in vitro</i>	Умеренная цитотоксическая активность в отношении клеточных линий HL-60, A549, DU145	Противоопухолевые препараты	10.1016/j.foodchem.2012.10.041
			<i>in vitro</i>	Нейропротекторное действие на повреждение клеток дофаминергической нейробластомы человека индуцированное пероксидом водорода	Нейропротекторные антиоксиданты	10.1016/j.jff.2018.04.026
80	Конгмуенозид III (конгмуенозид E)	1417579-28-2	<i>in vitro</i>	Нейропротекторная активность	Облегчение симптомов нейродегенеративных заболеваний	10.1016/j.biopha.2017.10.106
81	Элатозид H	171828-78-7	<i>in vivo</i>	Выраженная гипогликемическая активность в тесте на толерантность к глюкозе	Лечение сахарного диабета	10.1248/cpb.43.1878
82	Эклалбасапонин I (эклалбасапонин C)	158511-59-2	<i>in vitro</i>	Нейропротекторная активность	Облегчение симптомов нейродегенеративных заболеваний	10.1016/j.biopha.2017.10.106

№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
			<i>in vitro</i>	Ингибитор прокоагулянтной активности тканевого фактора	Лечение рака и сердечно-сосудистые заболеваний	10.1016/j.bmcl.2016.12.066
			<i>in vitro</i>	Нейропротекторная активность	Облегчение симптомов нейродегенеративных заболеваний	10.1016/j.biopha.2017.10.106
			<i>in vitro</i>	Подавление окислительного стресса в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y	Облегчение симптомов нейродегенеративных заболеваний	10.1080/10715762.2019.1620937
83	Гликозид St-B (гликозид L-B ₁)	68579-28-2	<i>in vitro</i>	Противомикробная активность в отношении <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. typhi</i> и <i>C. albicans</i>	Лечение инфекционных заболеваний	10.1080/14786419.2018.1503262
			<i>in vitro</i>	Антипролиферативная активность в отношении линии клеток рака яичников человека A2780	Противоопухолевые препараты	10.1177/1934578X1501000407
84	Аралия-сапонин I (<i>Aralia elata</i>)	289649-54-3	не изучалась			
85	Аралия-сапонин III (<i>Aralia elata</i>)	289649-66-7	не изучалась			
86	Аралия-сапонин VI (<i>Aralia elata</i>)	340982-21-0	<i>in vitro</i>	Цитотоксичность в отношении клеточной линии аденокарциномы легкого A549	Противоопухолевые препараты	10.1002/cbdv.201200087
			<i>in vitro</i>	Воздействие на апоптоз эндотелиальных клеток пупочной вены человека, вызванный липопroteинами низкой плотности	Лечение аутоиммунных заболеваний	10.1080/10826076.2017.1399138
87	3-О-[β-D-глюкопиранозил(1 → 3)-α-L-арабинопиранозил]-эхиноцистовая кислота (гликозид St-D ₁)	371979-83-8	<i>in vitro</i>	Антипролиферативная активность в отношении линии клеток рака яичников человека A2780	Противоопухолевые препараты	10.1177/1934578X1501000407
88	6'-О-Бутиловый эфир эхиноцистовой кислоты-3-О-β-D-глюкопиранозил-(1-3)-β-D-глюкуронопиранозид	1357304-75-6	не изучалась			
89	3-О-β-D-глюкопиранозил-(1 → 3)-β-D-глюкопиранозил-(1 → 3)-β-D-глюкопиранозил эхиноцистовая кислота	1588875-38-0	не изучалась			

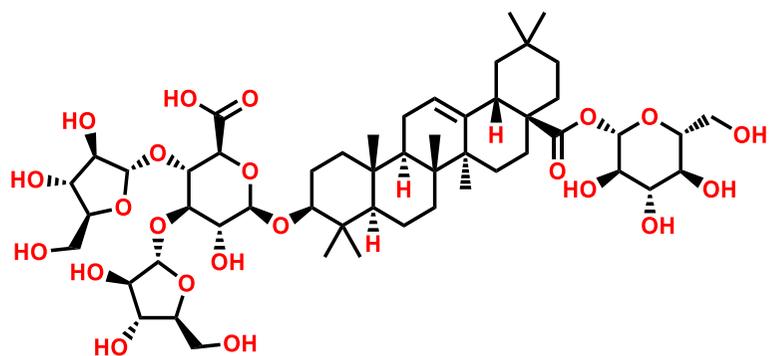
№	Наименование	CAS номер	Модель	Структура – активность	Потенциальное применение в фармацевтической промышленности	Источник
90	Конгмунозид II (аралиясапонин II (<i>Aralia elata</i>))	289649-65-6			не изучалась	
91	Конгмунозид VIII (аралиясапонин VIII (<i>Aralia elata</i>))	340982-23-2			не изучалась	
92	Конгмуянозид I	1033436-71-3			не изучалась	
93	Конгмуянозид А	894788-65-9	<i>in vitro</i>	Ингибирующее действие на образование супероксид-анионов, индуцируемых формил-L-метионил-L-лейцил-фенилаланин/цитохалазином В, и высвобождение эластазы в нейтрофилах человека	Противовоспалительные средства	10.1055/s-2006-951679
94	Конгмуянозид Е	1422176-49-5	<i>in vitro</i>	Низкая цитотоксическая активность в отношении раковых клеток HL60 и A549	-	10.1016/j.fitote.2012.03.015
95	Глюкокаулофиллогенин	79378-92-0	<i>in vitro</i>	Ингибирующее воздействие на α -глюкозидазу	Лечение сахарного диабета	10.1016/j.phytol.2018.06.002
			<i>in vitro</i>	Нейропротекторное действие на повреждение клеток дофаминергической нейробластомы человека индуцированное пероксидом водорода	Нейропротекторные антиоксиданты	10.1016/j.jff.2018.04.026
96	Конгмуенозид IV	1417579-29-3			не изучалась	
97	Конгмуенозид С	1431883-08-7	<i>in vitro</i>	Незначительная цитотоксическая активность в отношении клеточных линий HepG-2, Skov3, A549	-	10.1002/cbdv.201200087
98	Элатозид G	171828-77-6	<i>in vivo</i>	Выраженная гипогликемическая активность в тесте на толерантность к глюкозе	Лечение сахарного диабета	10.1248/cpb.43.1878



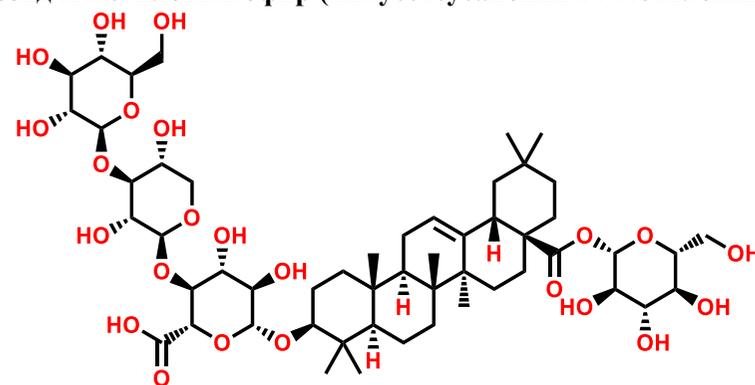
Аралозид А (чikusетсусапониn IV, олеанозид E)



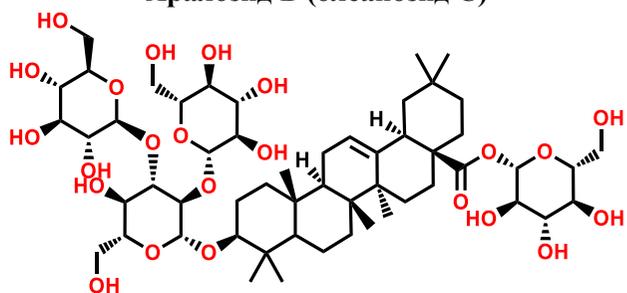
Аралозид А метилoвый эфир (чikusетсусапониn IV метилoвый эфир)



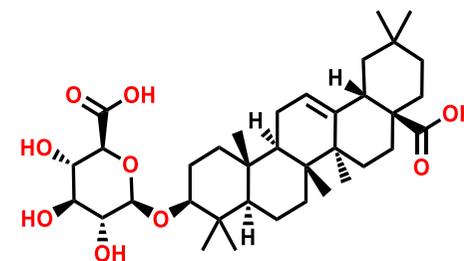
Аралозид B (олеанозид C)



Аралозид C (олеанозид A)

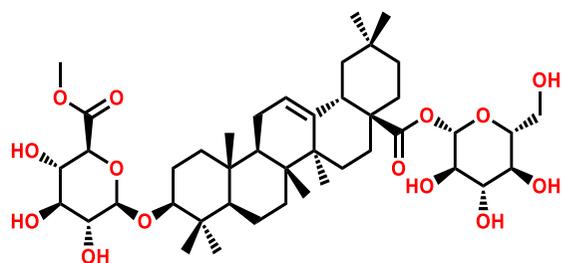


Аралозид G

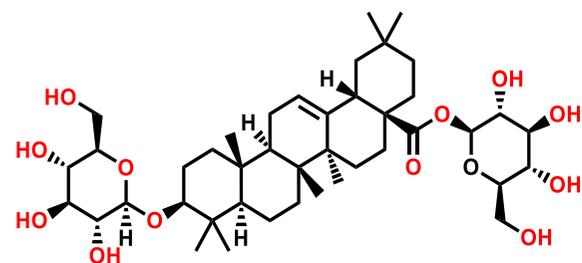


Календулозид E (момордин Ib, полисциасапониn P7, шеффлерозид I, сильфиозид F)

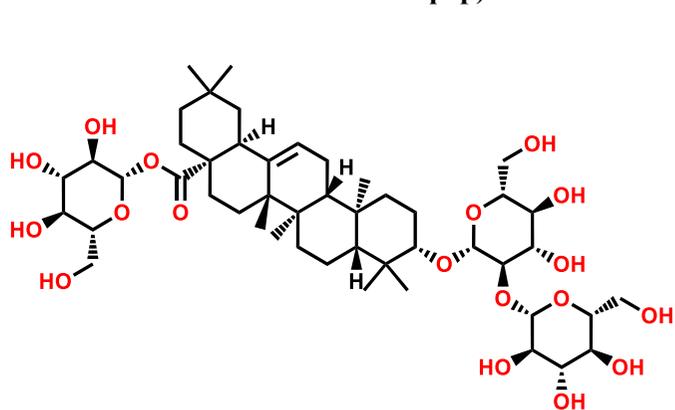
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской



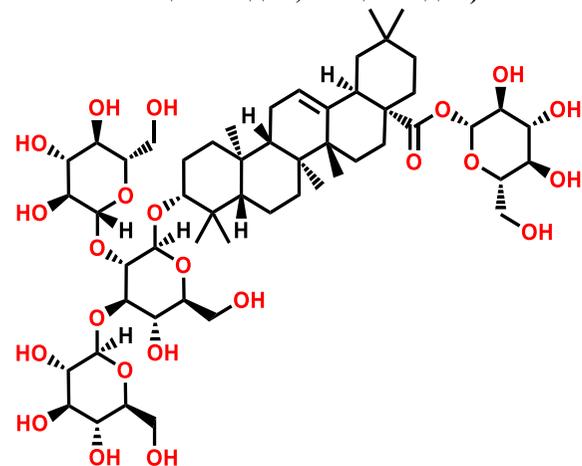
Сильфиозид А (календулозид F монометилвый эфир, чикусетсапонин IVa метилвый эфир)



Сильфиозид В (ахирантозид II, люцинозид H, люцинозид H)

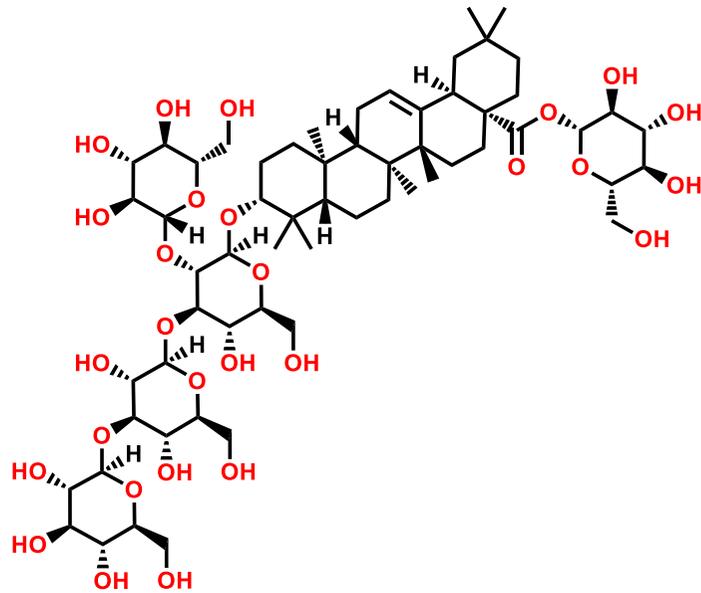


Сильфиозид Е

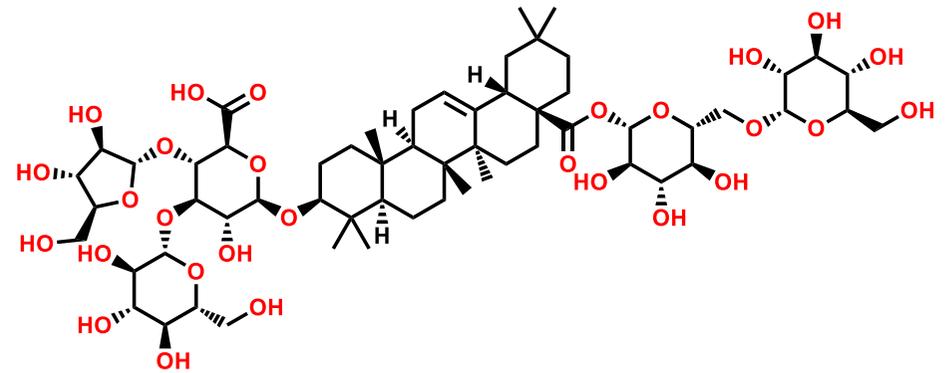


Конгмунозид V (аралиясапонин V, аралозид V)

Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)

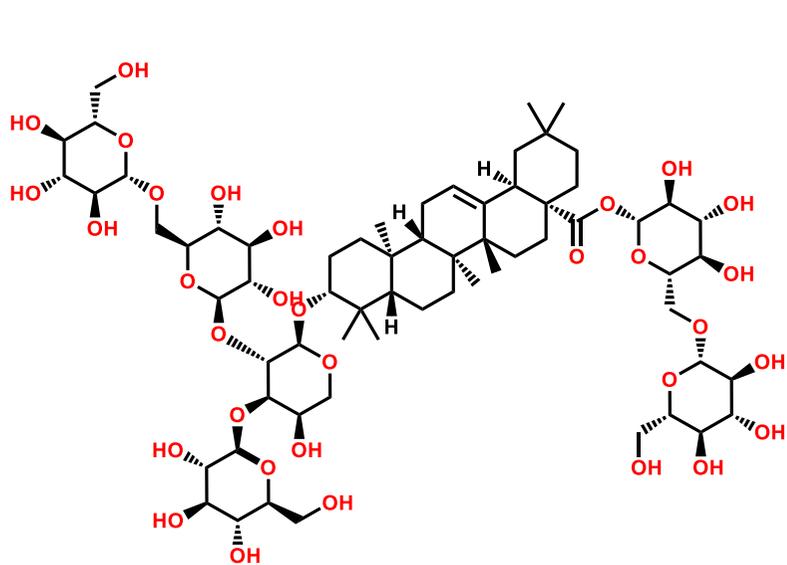


Конгмунозид X (аралозид X)

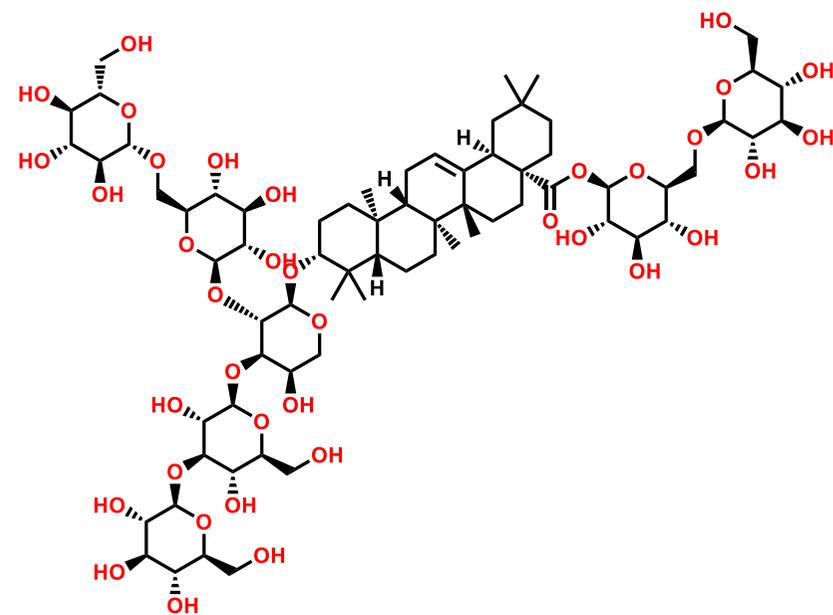


Конгмунозид XI

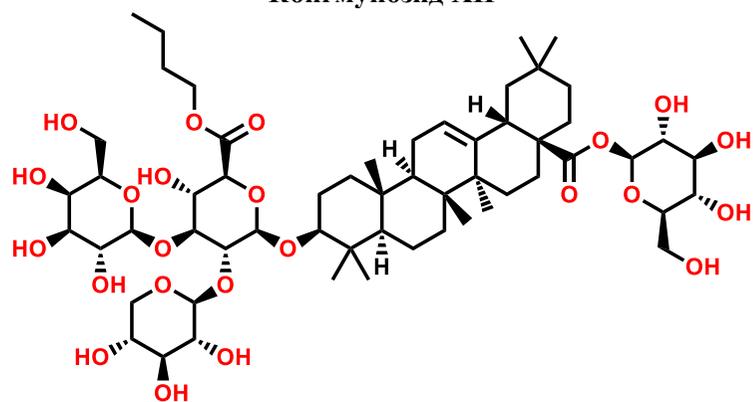
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



Конгмунозид XII

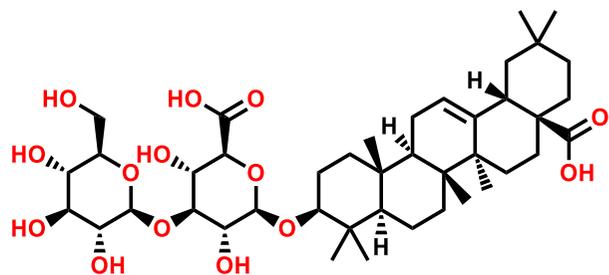


Конгмунозид XIII

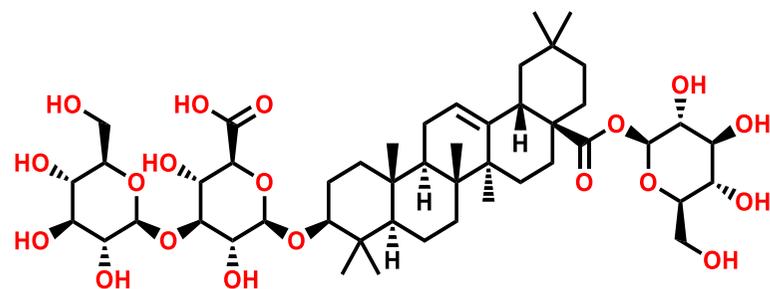


Конгмунозид XIV

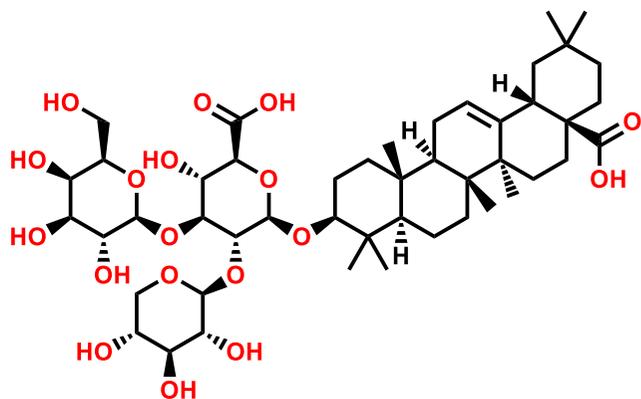
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов *Аралии маньчжурской* (продолжение)



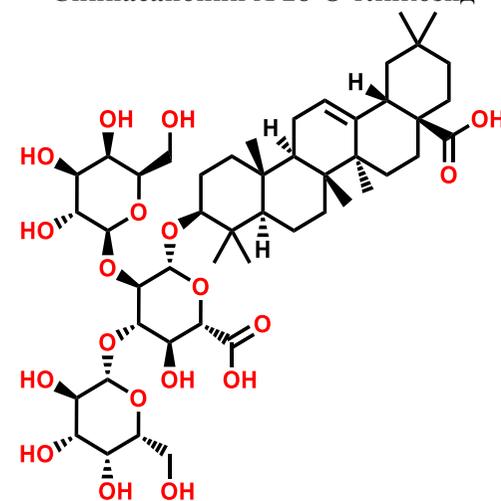
Спинасапонин А (калопанакс сапонин Е)



Спинасапонин А 28-О-гликозид

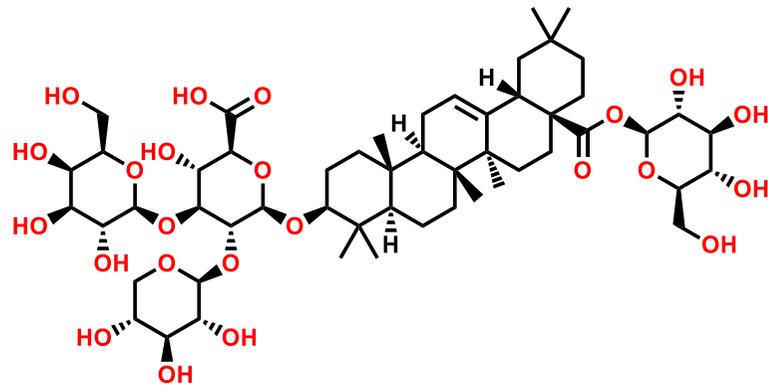


Элатозид А (тарасапонин II)

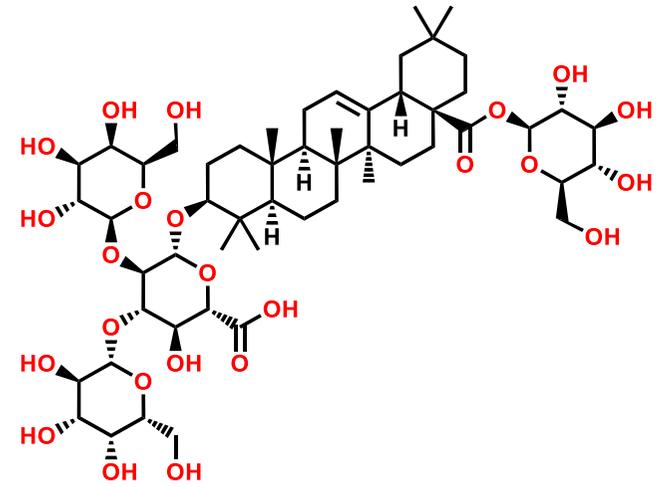


Элатозид В

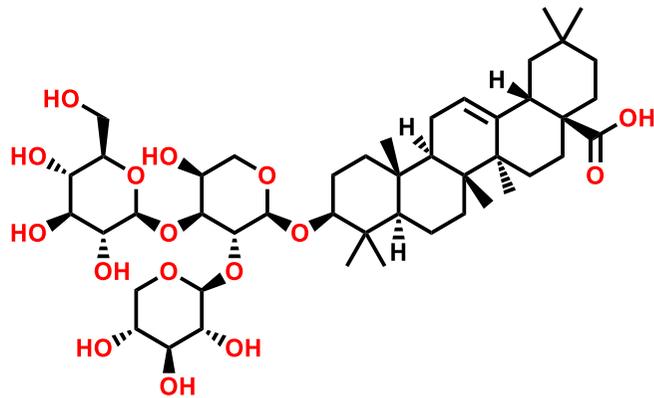
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



Элатозид С



Элатозид D



Элатозид E (тарасапонин III)

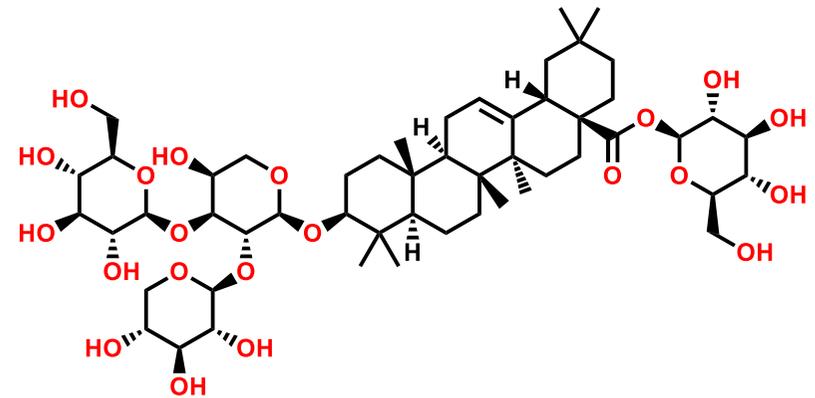
Элатозид F (караганозид А,
тарасапонин VII)

Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)

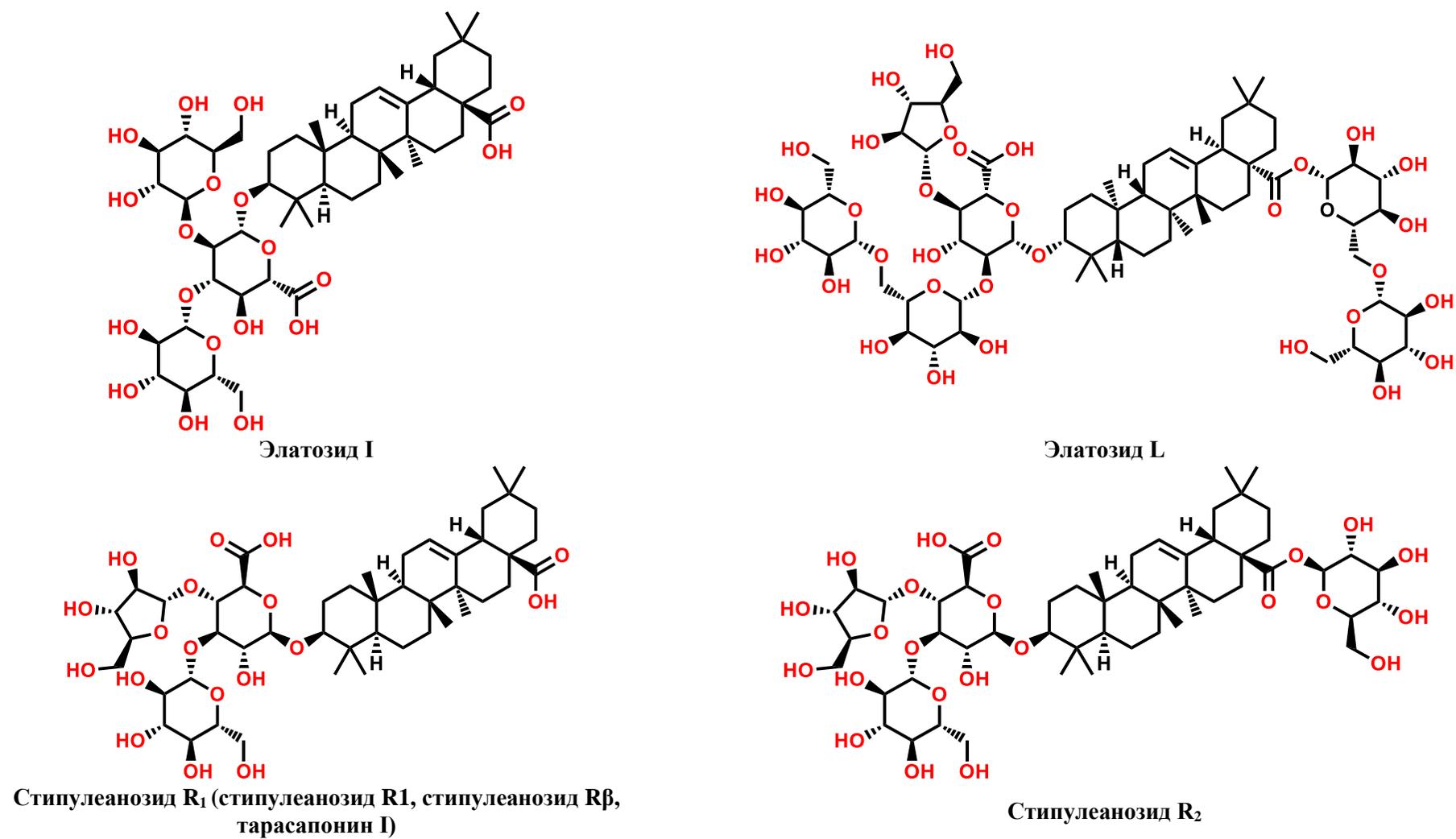
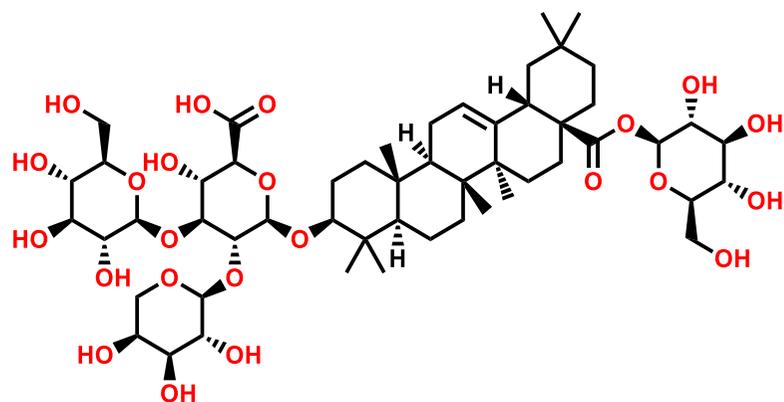
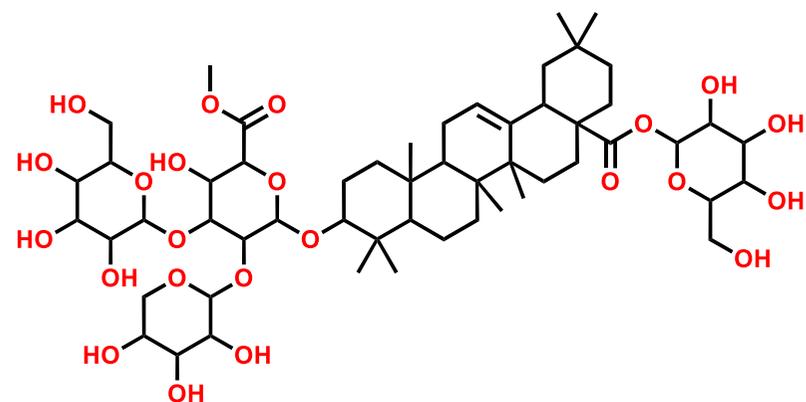


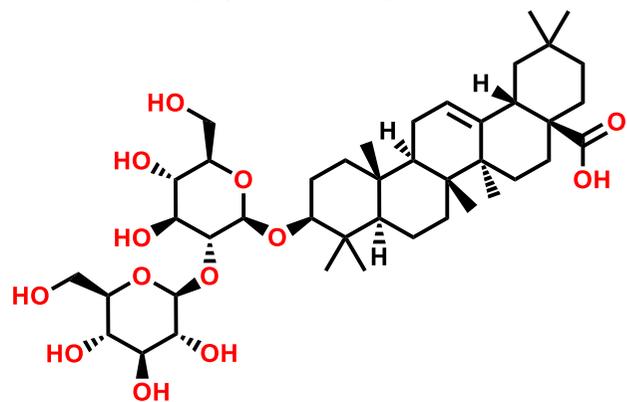
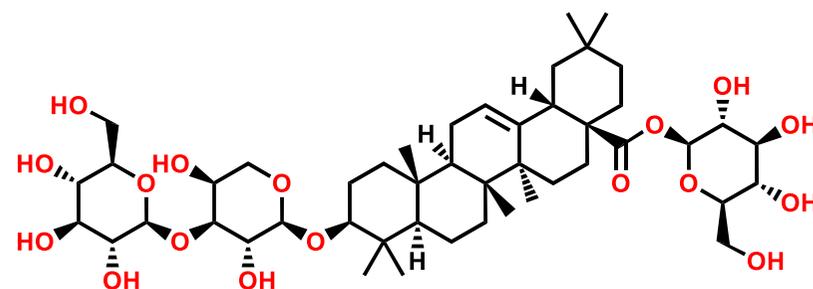
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



Калопанакс сапонин F

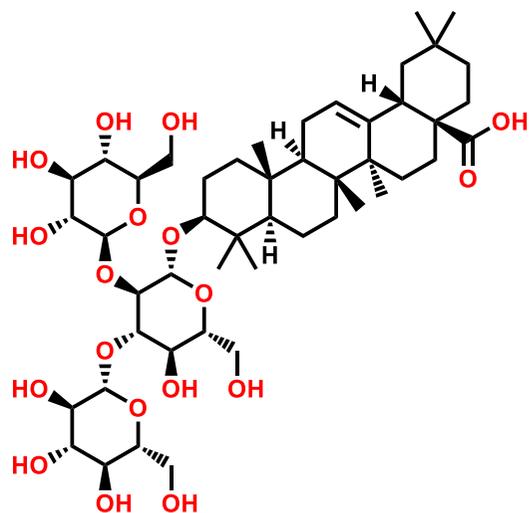


Калопанакс сапонин F метиловый эфир

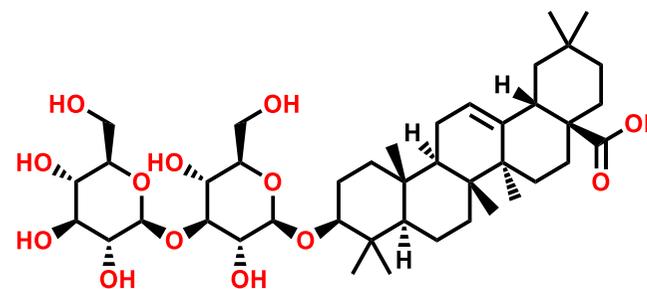
Акутозид А (гедерозид Е2,
олеаноловая кислота-3-софорозид)

Гуаиацин В

Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



Анчүзозид 2



Рандианин

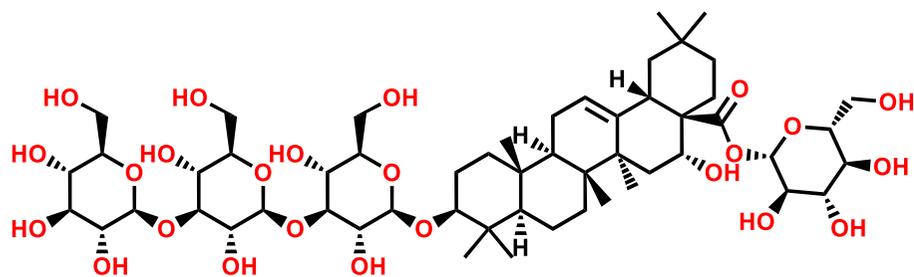
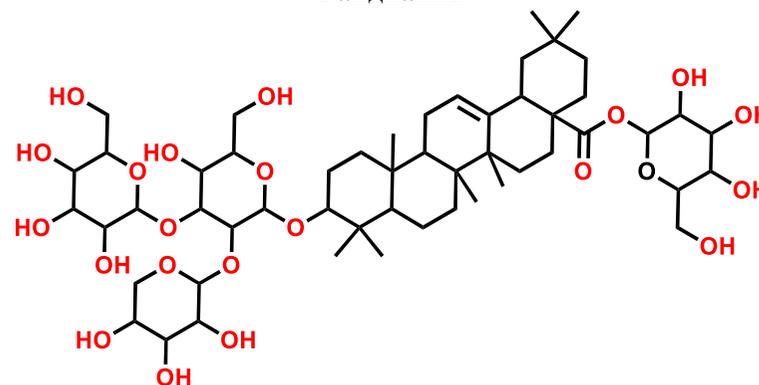
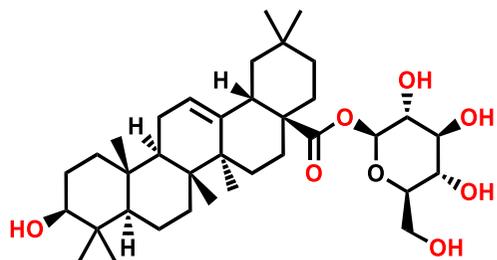
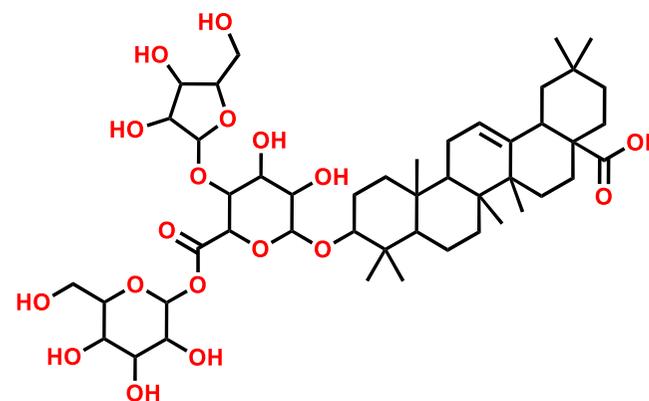
Аралиясапонин IV (*Aralia elata*)Аралиясапонин IV (*Aralia decaisneana*)

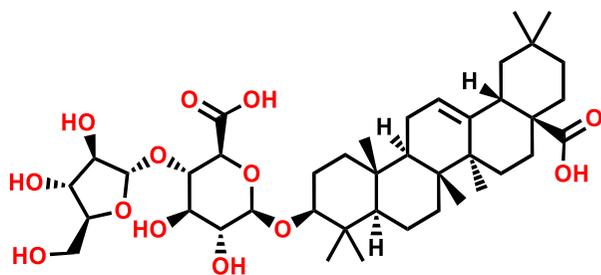
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



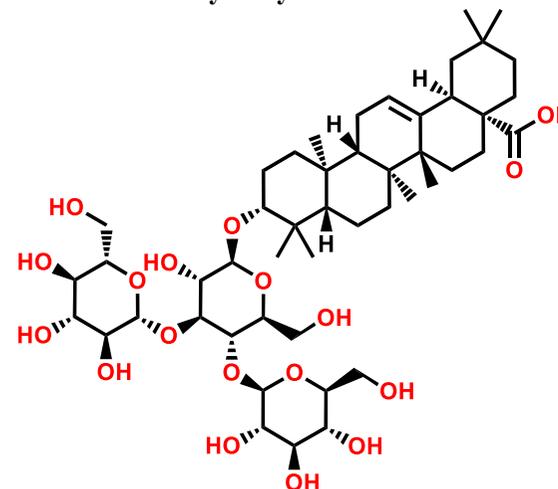
Чикусетсусапонин (1)



Чикусетсусапонин Ib

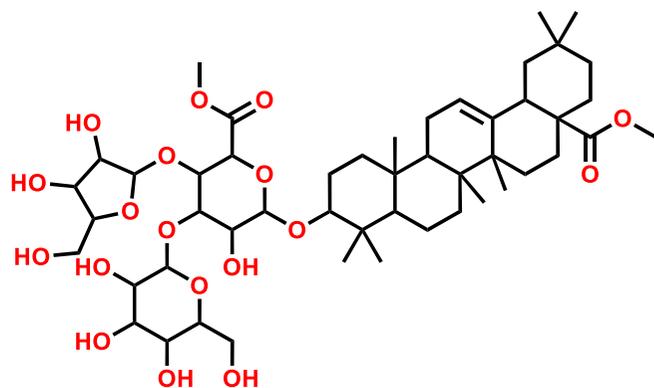


Нарциссифлорин (тарасапонин VI, 28-дегликозилчikusетсусапонин IV)

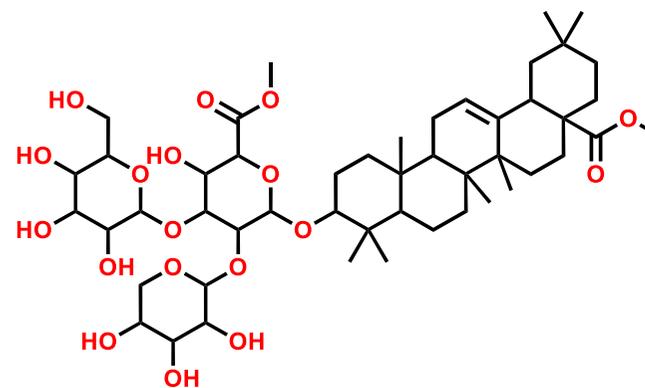


3-*O*-{ β -*D*-галактопиранозил-(1 \rightarrow 3)[β -*D*-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)]- β -*D*-глюкопиранозил} олеаноловая кислота (28 \rightarrow 1)- β -*D*-глюкопиранозильный эфир

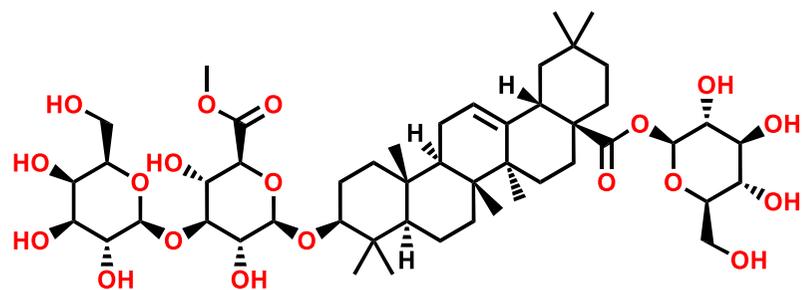
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов *Аралии маньчжурской* (продолжение)



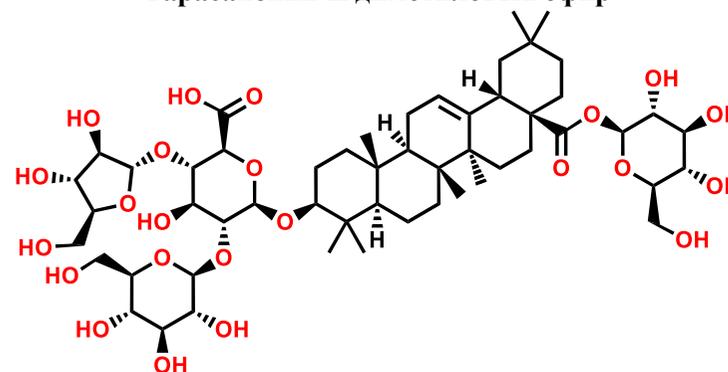
Тарасапонин I диметиловый эфир



Тарасапонин II диметиловый эфир

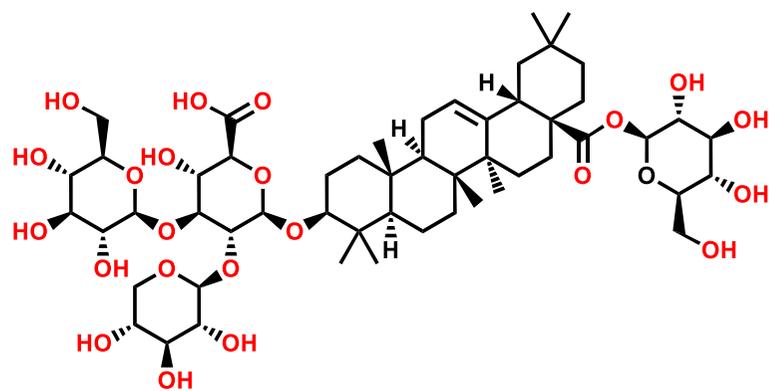


Тарасапонин III метиловый эфир (календулагликозид С 6'-О-метиловый эфир)

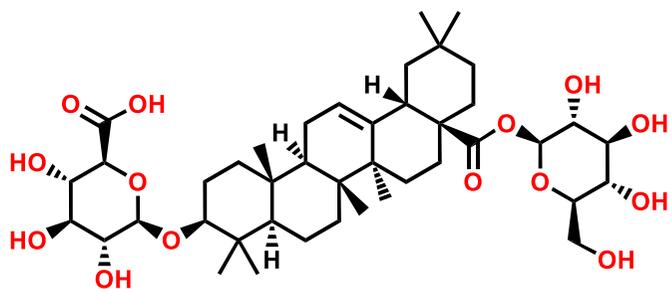
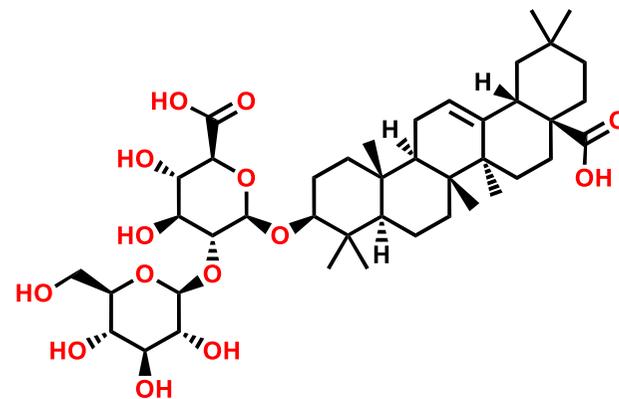


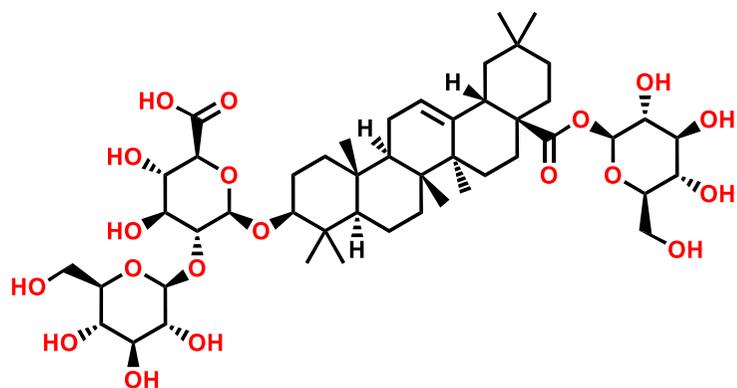
Тарасапонин IV

Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)

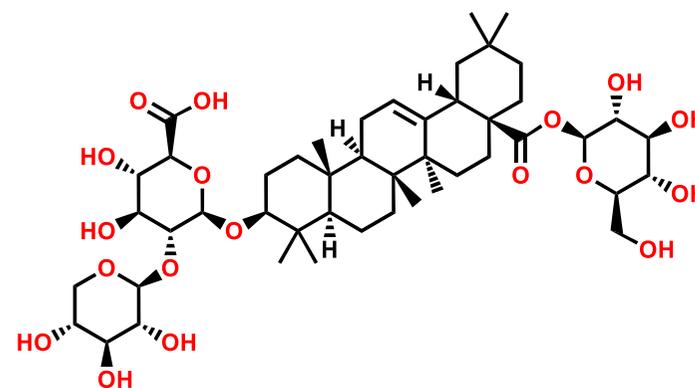


Тарасапонин V (элатозид K)

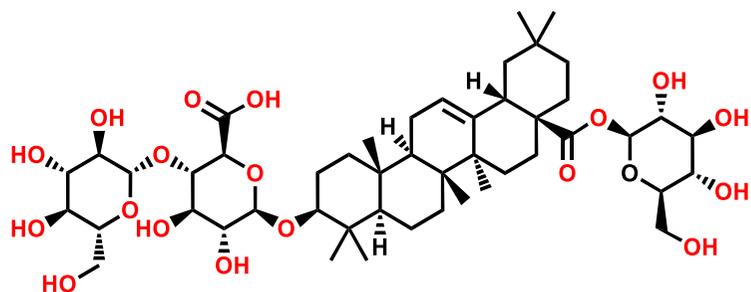
Чикусетсусапонин IV_aЗингиброзид R₁ (гинсенозид Z-R₁
полисциасапонин P₅)*Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)*



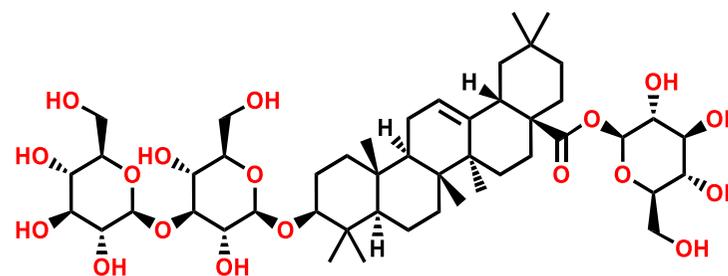
Чикусетсусапони V (гинсенозид Ro, полиацилсапонин P₃)



Псевдогинсенозид RT₁

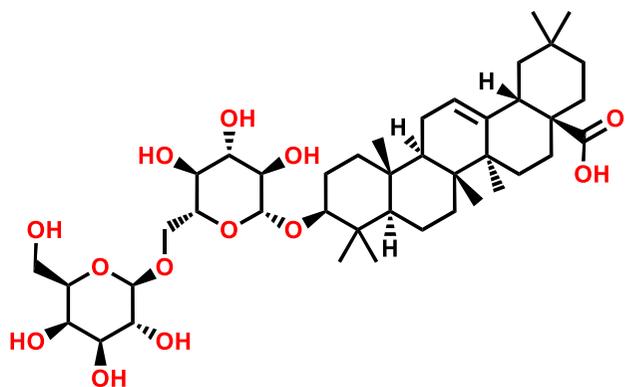


3-O-[\beta-D-глюкопиранозил-(1→4)-\beta-D-глюкуронопиранозил]-олеаноловой кислоты 28-O-\beta-D-глюкопиранозил эфир (туберозид A)

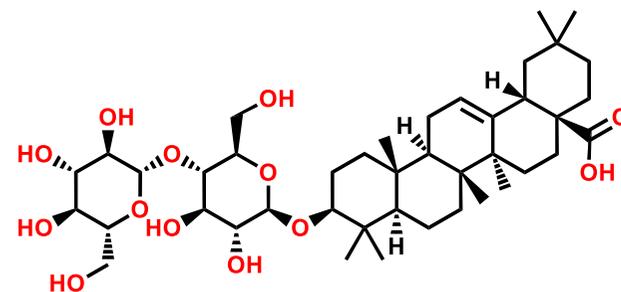


3-O-\beta-D-глюкопиранозил-(1→3)-\beta-D-глюкопиранозил олеаноловой кислоты 28-O-\beta-D-глюкопиранозид (анчузозид 7)

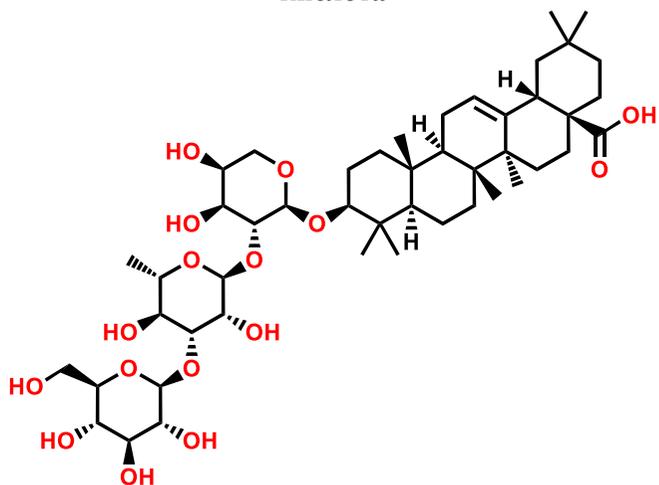
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



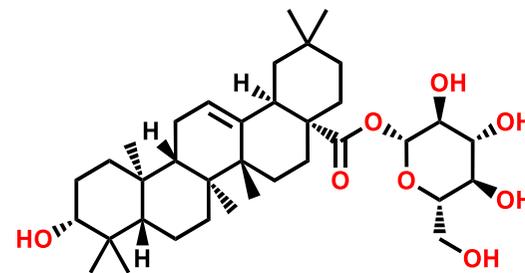
3-O-[[β -D-галактопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-глюкопиранозил] олеаноловая кислота



3-O- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)- β -D-глюкопиранозил олеаноловая кислота

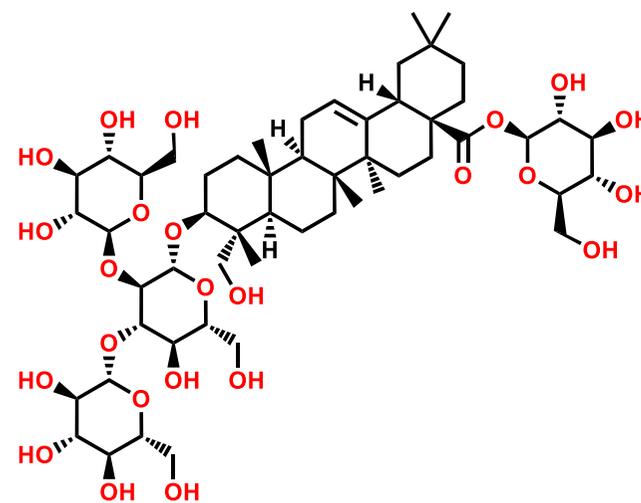


3-O- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 3)- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)- α -L-арабинопиранозид олеаноловой кислоты (асперосапонин G, пулсатилла сапонин I)

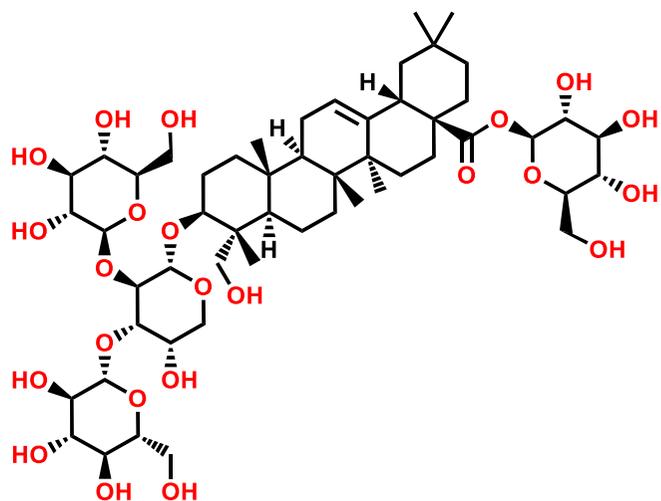


28-O- β -D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты

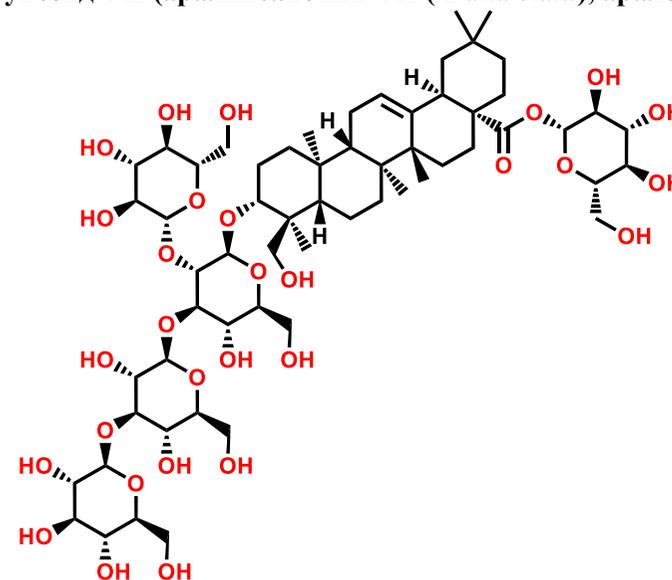
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



Конгмунозид VII (аралиясапонин VII (*Aralia elata*), аралозид VII)

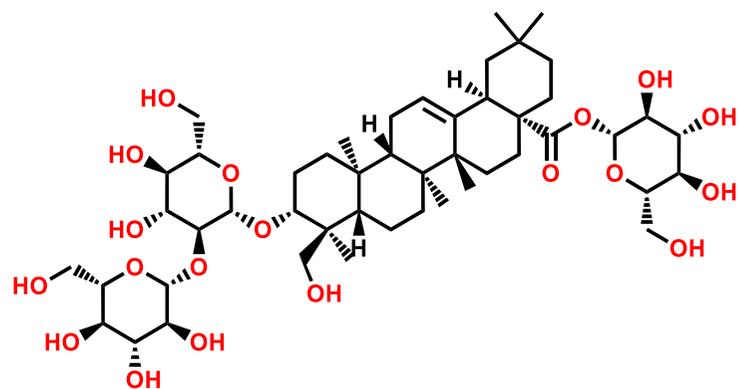


Конгмунозид IX (аралия-сапонин IX (*Aralia elata*))

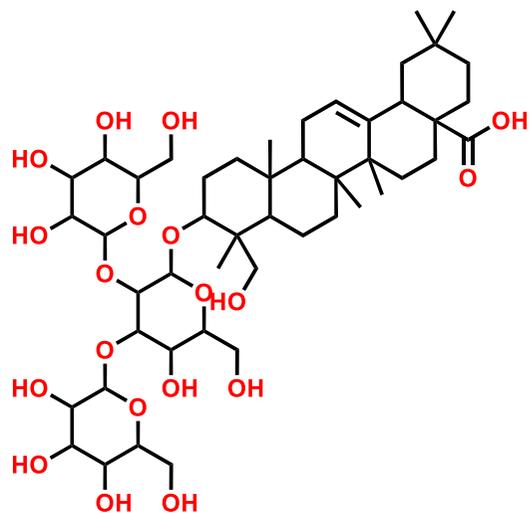


Конгмунозид D

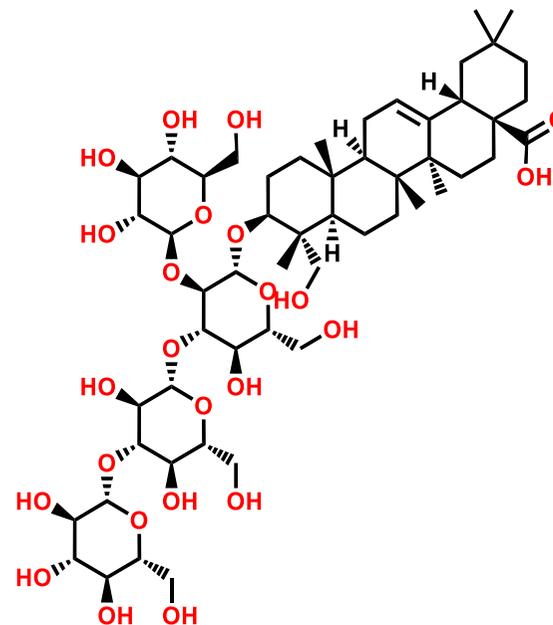
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



Конгмуенозид II

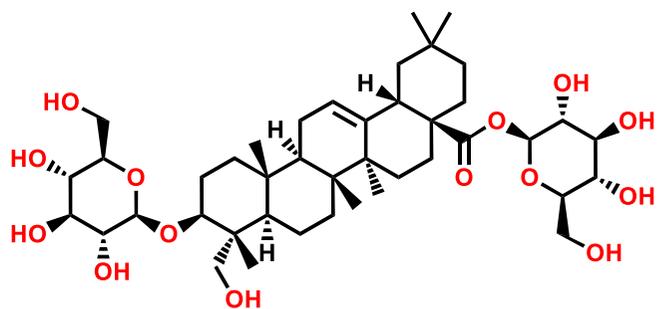


Конгмуенозид А (элатозид J)

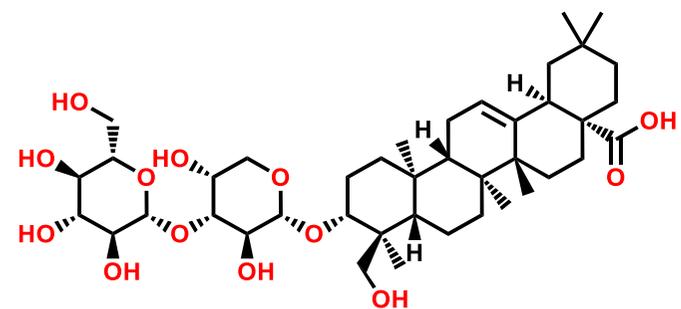


Конгмуенозид В

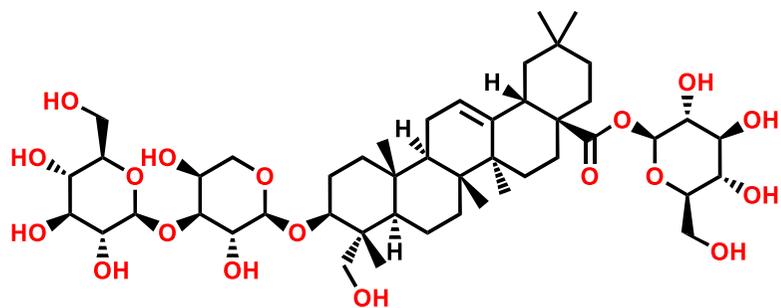
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов *Аралии маньчжурской* (продолжение)



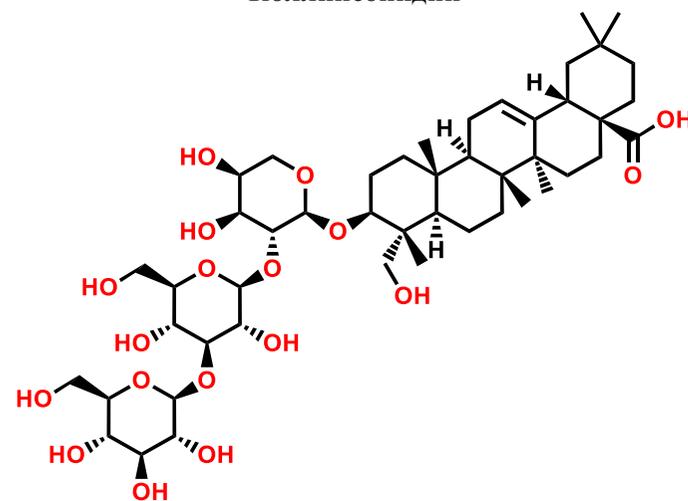
Люцинозид E (люцинозид E)



Коллинсонин

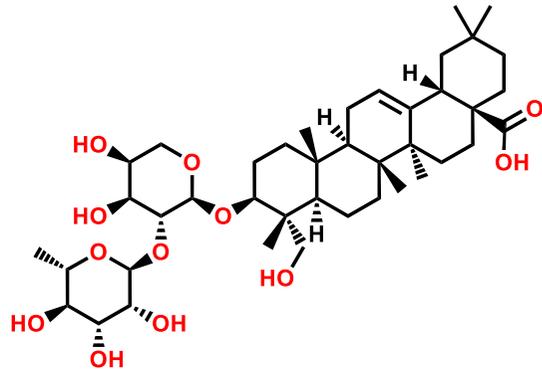


Киноасапонин B

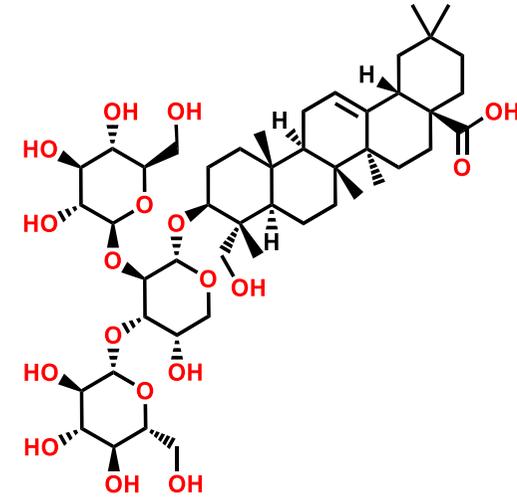


Дурупкозид C

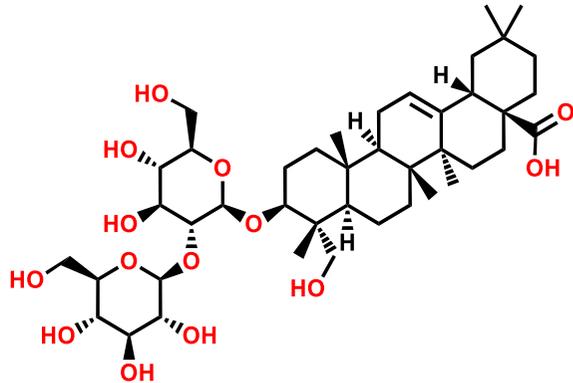
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



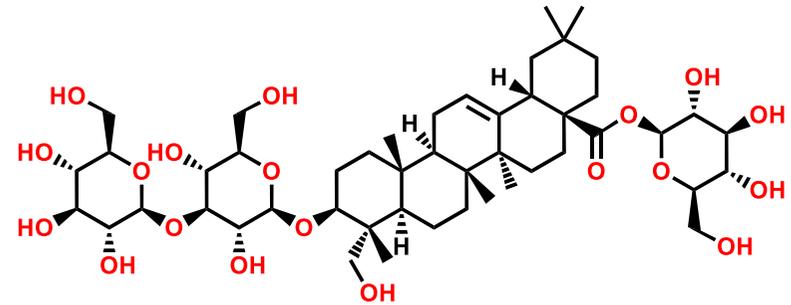
α -гедерин (гедерозид С, калопанакс сапонин А)



3-О-[β -D-глюкопиранозил-(1–2)- β -D-глюкопиранозил-(1–3)]- α -L-арабинопиранозил гедерагенин

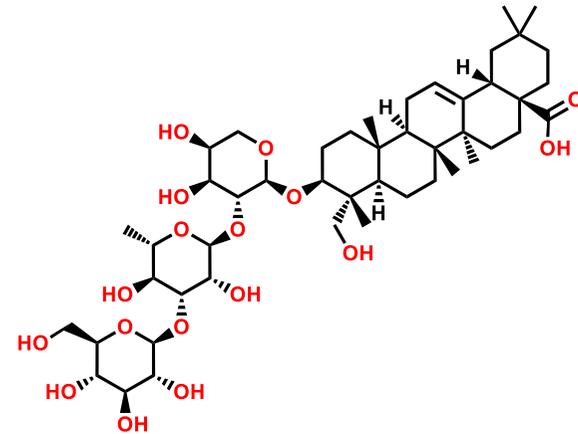


3-О-[β -D-глюкопиранозил-(1→2)- β -D-глюкопиранозил] гедерагенин (гедерозид F)

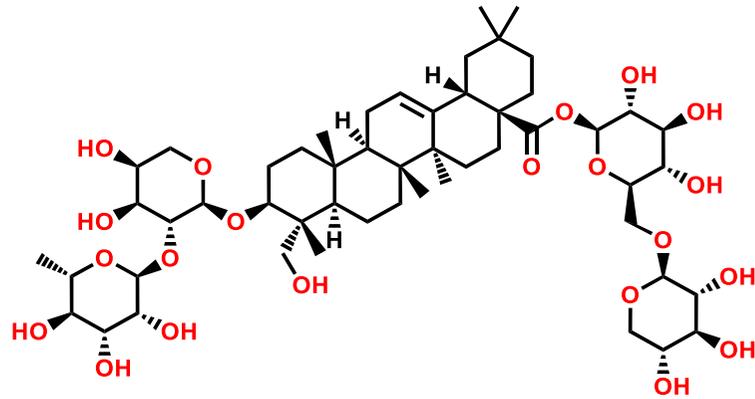


3-О-[β -D-глюкопиранозил-(1 → 3)- β -D-глюкопиранозил] гедерагенина 28-О- β -D-глюкопиранозильный эфир

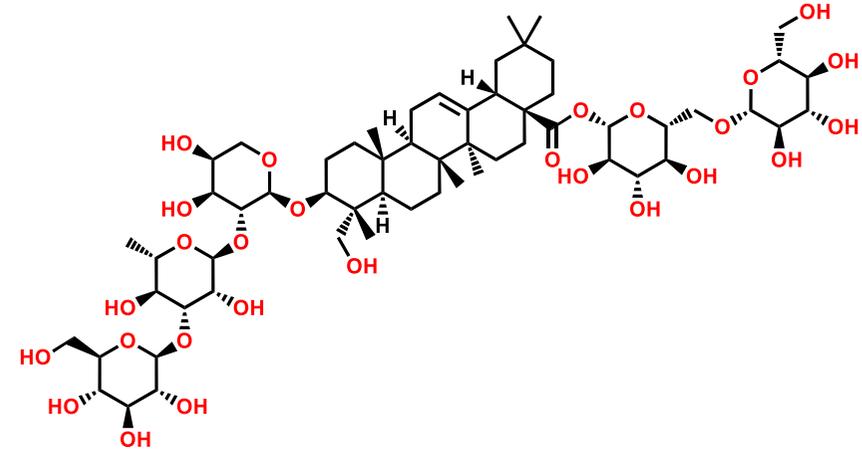
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



Гедерагенина 3-О-β-D-глюкопиранозил-(1 → 3)-α-L-рамнопиранозил-(1 → 2)-α-L- арабинопиранозид
(калопанаксапонин Н)

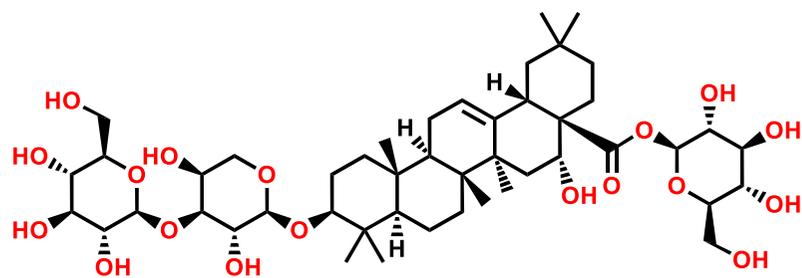


3-О-α-L-рамнопиранозил-(1 → 2)-α-L-арабинопиранозил гедерагенина
28-О-β-D-ксилопиранозил-(1 → 6)-β-D-глюкопиранозидовый эфир

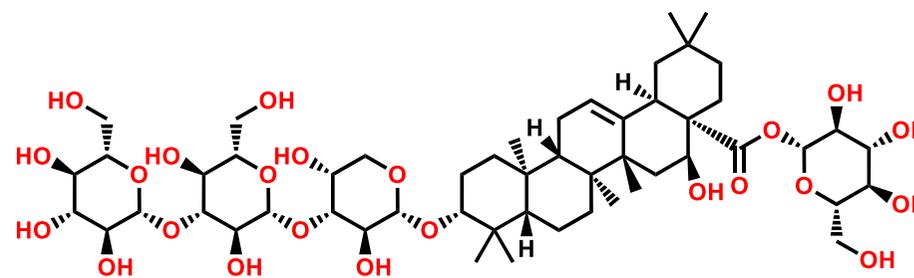


3-О-β-D-глюкопиранозил-(1 → 3)-α-L-рамнопиранозил-(1 → 2)-α-L-арабинопиранозил гедерагенина 28-О-β-D-глюкопиранозил-(1 → 6)-β-D-глюкопиранозидовый эфир

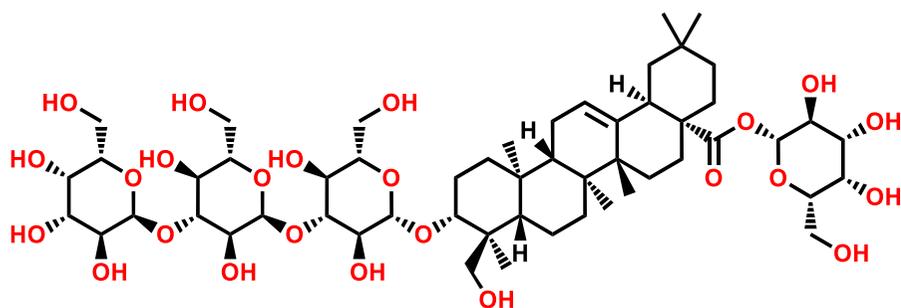
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



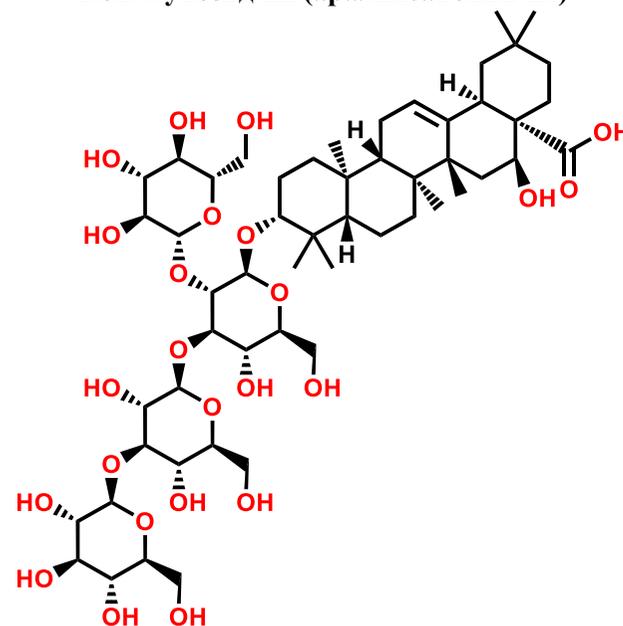
Конгмуозид I (аралиясапонин I)



Конгмуозид III (аралиясапонин III)



Конгмуозид IV



Конгмуозид XV

Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)

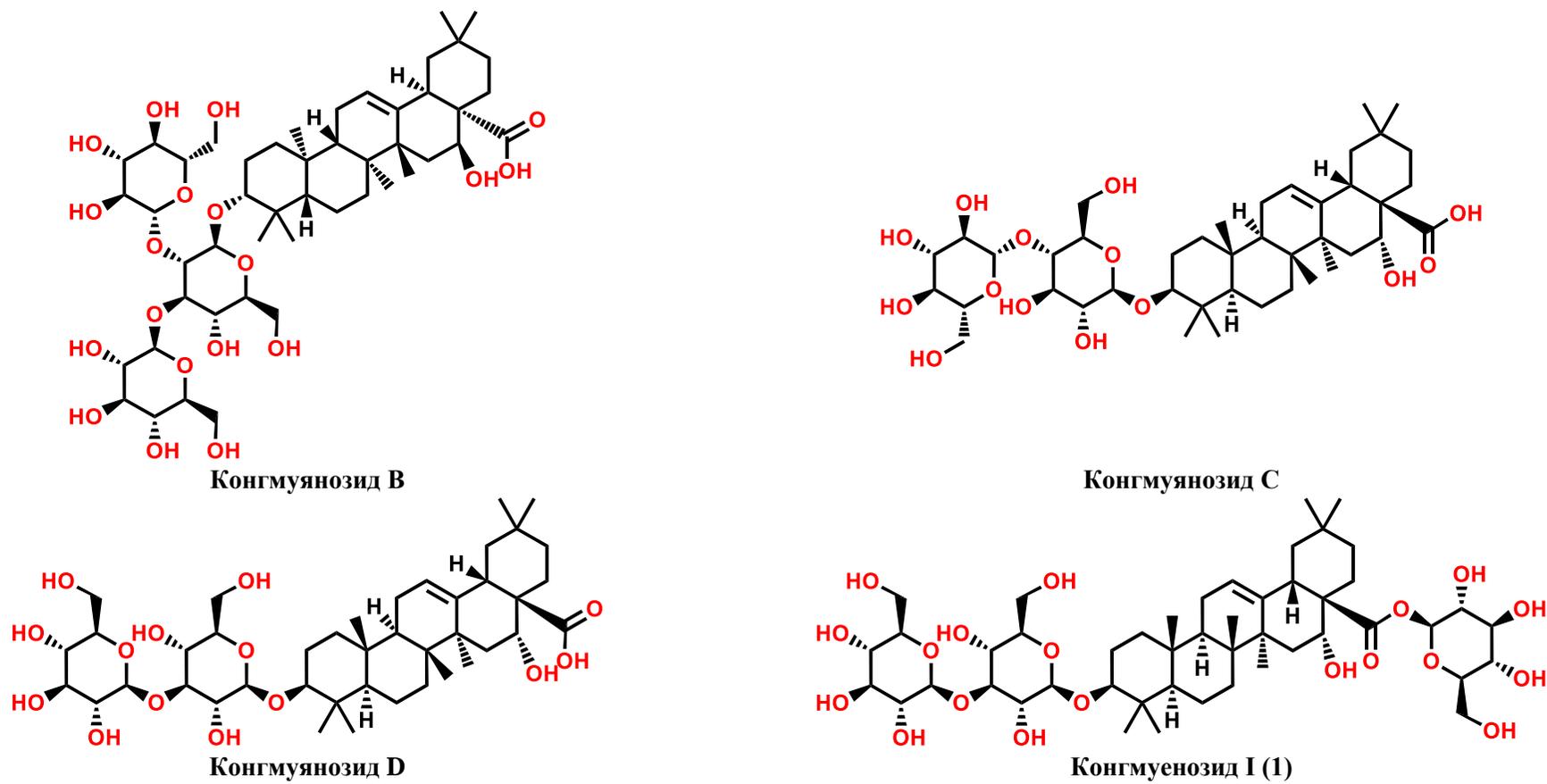
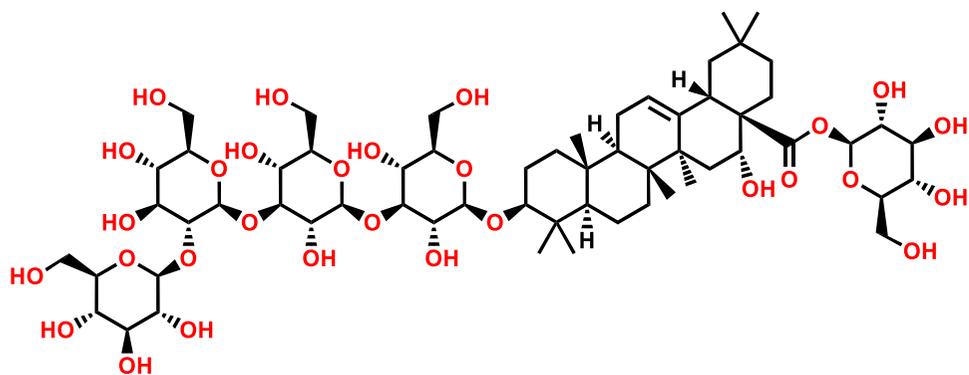
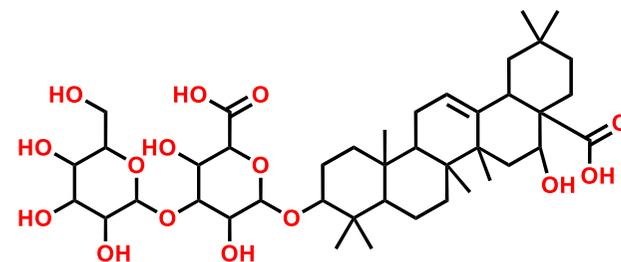


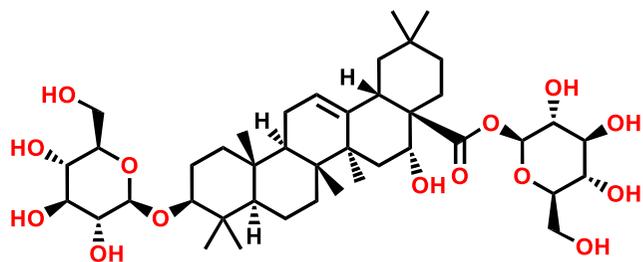
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



Конгмуеносид III (конгмуеносид E)



Элатозид H



Экхалбасопонин I (экхалбасопонин C)

Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)

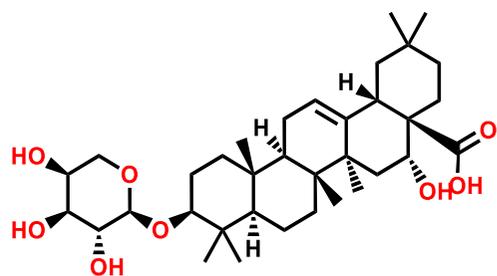
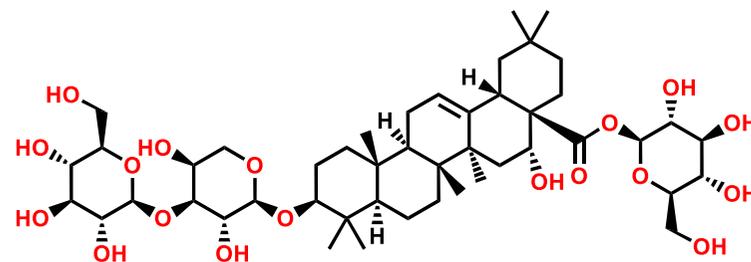
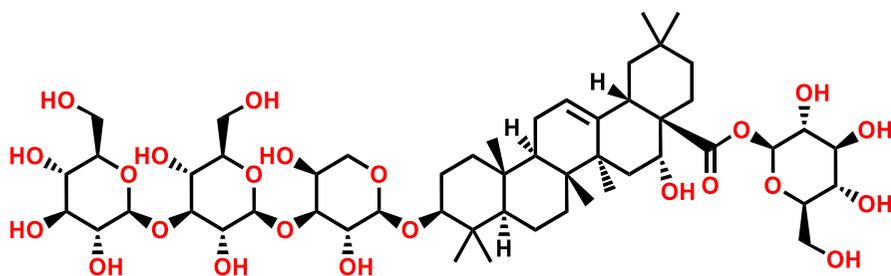
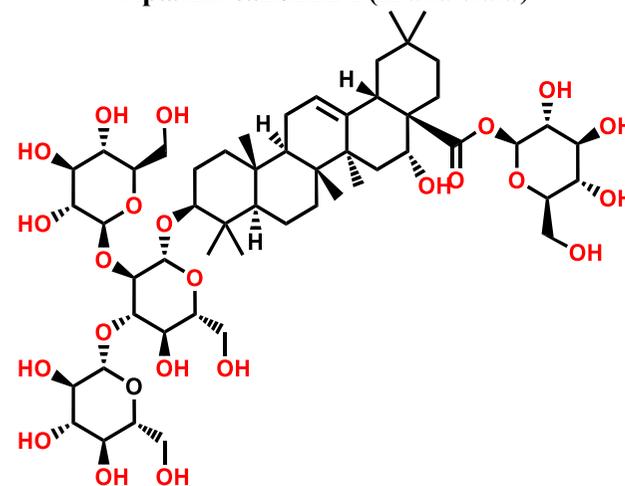
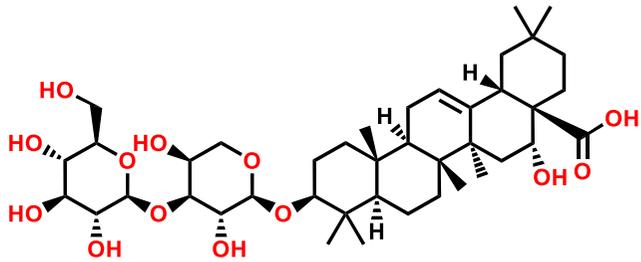
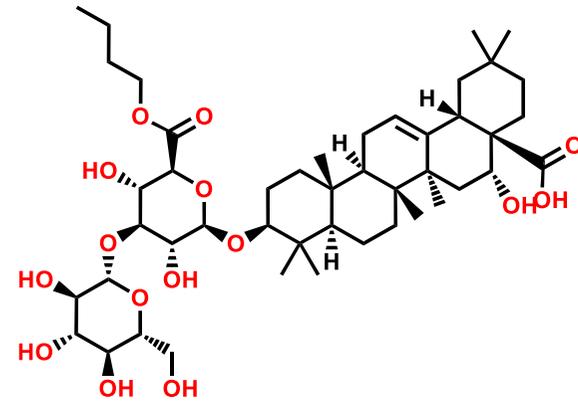
Гликозид St-B (гликозид L-B₁)Аралия-сапонин I (*Aralia elata*)Аралия-сапонин III (*Aralia elata*)Аралия-сапонин VI (*Aralia elata*)

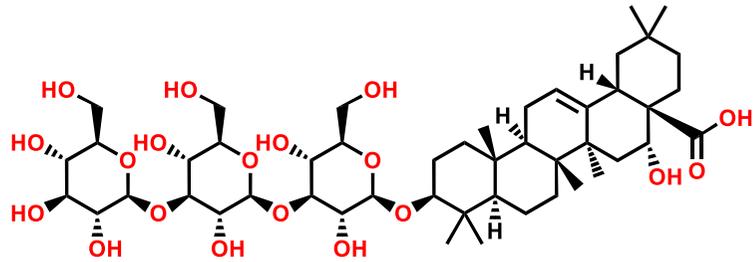
Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



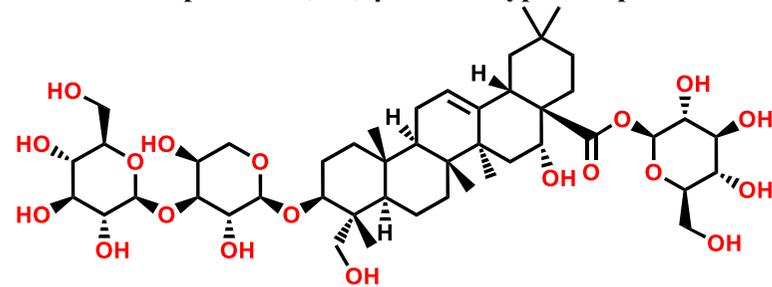
3-O-[[β-D-глюкопиранозил(1 → 3)- α-L-арабинопиранозил]-
эхиноцистовая кислота (гликозид St-D₁)



6'-О-Бутиловый эфир эхиноцистовой кислоты-3-О-β-D-
глюкопиранозил-(1-3)-β-D- глюкуронопиранозид

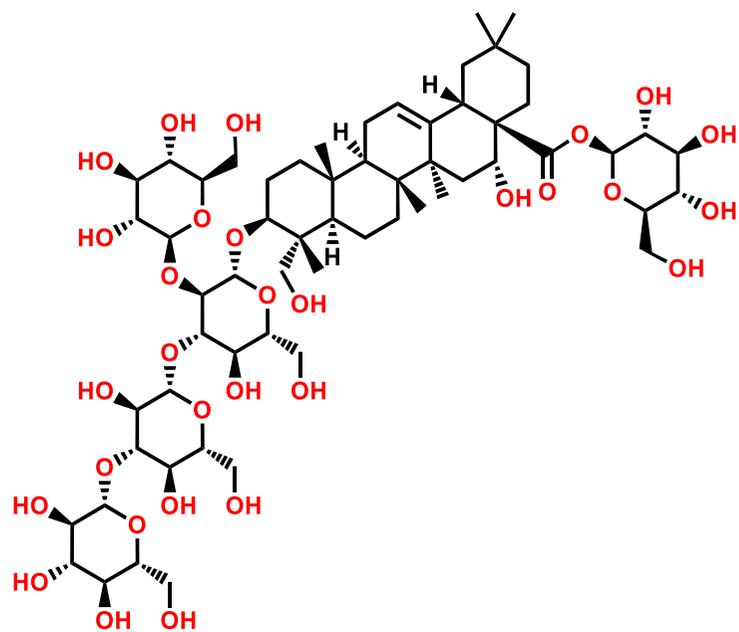


3-О-β-D-глюкопиранозил-(1 → 3)-β-D-глюкопиранозил-(1 → 3)-β-D-
глюкопиранозил эхиноцистовая кислота

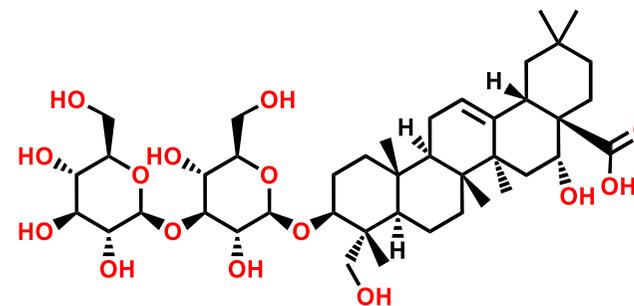


Конгмунозид II (аралиясaponин II (*Aralia elata*))

Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)



Конгмунозид VIII (аралиясапонин VIII (*Aralia elata*))



Конгмуанозид I

Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)

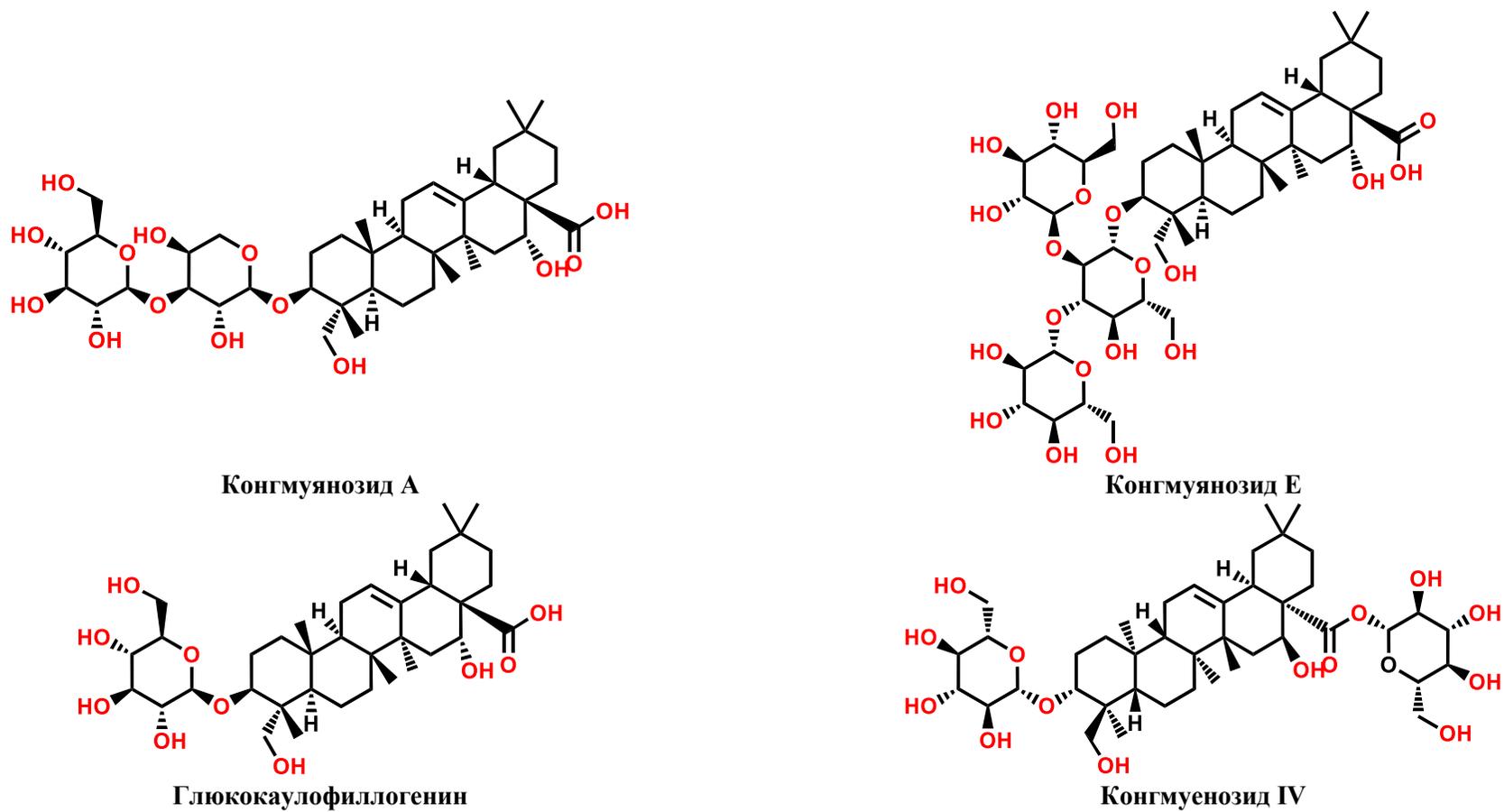
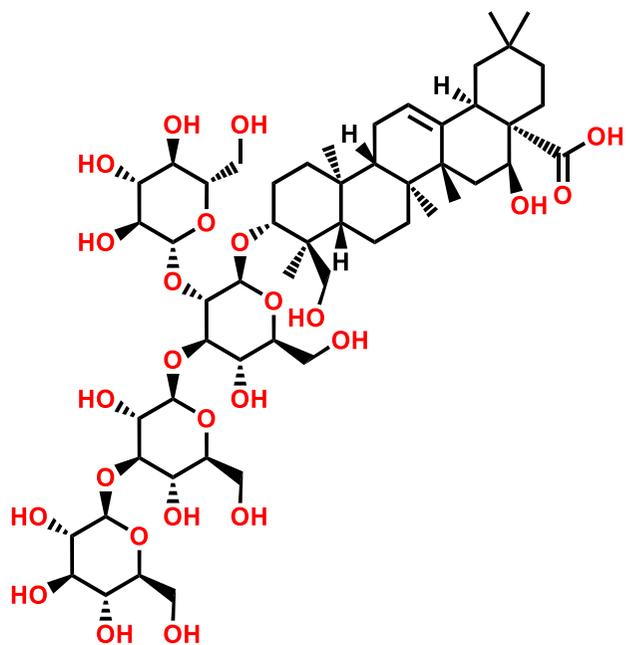
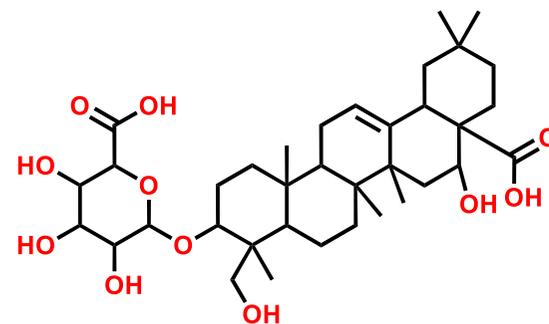


Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов *Аралии маньчжурской* (продолжение)



Конгмуеносид С



Элатозид G

Рисунок 1 – Структурные формулы тритерпеновых сапонинов Аралии маньчжурской (продолжение)

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Таблица 1. Идентифицированные тритерпеновые сапонины в корнях аралии маньчжурской при помощи обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии и квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометром с электроспрей ионизацией при использовании SWATH метода

№	tR (мин)	m/z [M-H]-экспериментальное	m/z [M-H]-расчетное	Элементный состав [M-H]-	Характер фрагментации MS2 – дочерние ионы, m/z (относительная интенсивность, %)	Δm (ppm)	Соединение
3	3,7	749,4481	749,4482	C ₄₁ H ₆₅ O ₁₂	455,3532 (60), 485,1508 (75), 617,4060 (35), 749,4481 (40)	0,13	α-гедерин
4	3,4	765,4443	765,4431	C ₄₁ H ₆₅ O ₁₃ ⁻	471,3479 (30), 959,3343 (20), 633,4011 (15), 757,3878 (100), 765,4443 (17)	-1,57	Коллинсонидин
5	3,5	778,3300	778,4509	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₃ •	425,1316 (10), 455,3541 (20), 485,1516 (65), 778,3300 (60)	155	Акутозид А
6	4,9	781,4171	781,4380	C ₄₁ H ₆₅ O ₁₄	387,2855 (90), 401,2492 (20), 619,3331 (10), 665,3183 (15), 779,4215 (10), 777,4070 (9), 780,4209 (8), 781,4171 (5)	27	Конгмуенозид А
7	4,6	809,4333	809,4329	C ₄₂ H ₆₅ O ₁₅	556,3175 (40), 751,4649 (30), 767,4594 (35), 779,4564 (15), 781,4732 (100), 793,4362 (90), 809,4333 (60)	-0,49	Элатозид Н
8	3,3	811,4519	811,4485	C ₄₂ H ₆₇ O ₁₅	345,2268 (100), 471,5677 (15), 485,1509 (30), 721,3301 (20), 777,3617 (28), 809,4022 (45), 811,4519 (48)	-4,2	Конгмуенозид IV
9	3,8	911,5015	911,5010	C ₄₇ H ₇₅ O ₁₇ ⁻	455,3515 (20), 617,4057 (15), 749,4479 (20), 877,4590 (18), 911,5015 (100)	-0,5	Гуаиацин В
10	4,5	925,4814	925,4802	C ₄₇ H ₇₃ O ₁₈	455,3541 (3), 569,3852 (30), 613,3746 (10), 775,4288 (4), 794,4439 (2), 925,4814 (100)	-1,3	Аралозид А
11	3,5	927,4955	927,4959	C ₄₇ H ₇₅ O ₁₈	471,3419 (20), 633,4008 (20), 747,4391 (18), 765,4456 (20), 795,4537 (40), 927,4955 (100)	0,5	Аралиясапонин I
12	5,1	939,4618	939,4959	C ₄₈ H ₇₅ O ₁₈	569,3852 (10), 631,3857 (26), 793,4388 (40), 847,4473 (20), 865,4611 (25), 939,4618 (100)	36	Аралозид А метиловый эфир
13	4,6	941,4753	941,4752	C ₄₇ H ₇₃ O ₁₉ ⁻	455,3509 (5), 471,3465 (5), 631,3852 (7), 747,4331 (35), 793,4388 (42), 809,4331 (3), 927,4957 (36), 941,4753 (100)	-0,1	Арматозид В
14	3,8	941,5046	941,5115	C ₄₈ H ₇₇ O ₁₈ ⁻	456,3556 (3), 585,3772 (5), 617,4064 (7), 779,4526 (20), 925,4833 (16), 941,5046 (100)	7,3	Акантозид D

15	3,5	943,4905	943,4908	$C_{47}H_{75}O_{19}$	765,4419 (18), 779,4282 (17), 927,4974 (60), 943,4905 (100)	0,3	Аралиясапонин II
16	3,9	953,5104	953,5115	$C_{49}H_{77}O_{18}^-$	455,3523 (15), 617,4082 (12), 749,4462 (18), 795,4536 (9), 822,4728 (9), 893,4927 (10), 911,5016 (30), 925,4814 (26), 953,5104 (100)	1,2	Тайбаиенозид II
17	4,9	955,4890	955,4908	$C_{48}H_{74}O_{19}^-$	454,3310 (3), 594,3418 (5), 761,4049 (6), 793,4257 (10), 823,3948 (5), 913,4877 (9), 925,4790 (25), 955,4890(100)	1,9	Календулагликозид С
18	4,4	957,4942	957,5067	$C_{48}H_{77}O_{19}^-$	791,4209 (10), 925,4787 (13), 955,4912 (100), 957,4942 (15)	13	Конгмуянозид В
19	4,5	1043,5432	1043,5432	$C_{52}H_{83}O_{21}^-$	569,3822 (15), 613,3765 (8), 731,4388 (9), 775,4326 (12), 925,4788 (100), 1043,5432 (9)	0	Южизиозид IV
20	4,4	1057,5363	1057,5225	$C_{52}H_{81}O_{22}^-$	455,3532 (2), 551,3732 (3), 585,3641 (3), 701,4259 (7), 745,4197 (3), 895,4713 (15), 911,5030 (5), 955,4884 (3), 1057,5363 (100)	13	Аралозид В
21	4,2	1087,5337	1087,5335	$C_{53}H_{83}O_{23}$	455,3501 (2), 551,3726 (2), 702,42875 (2), 775,4270 (2), 793,4383 (1,5), 925,4798 (8), 956,4949 (5), 1087,5337 (100)	- 0,6	Аралозид С
22	4,5	1089,5476	1089,5487	$C_{53}H_{85}O_{23}$	455,3521 (2), 587,3969 (5), 719,4372 (20), 749,4493 (13), 881,4925 (100), 925,4795 (12), 1043,5444 (35), 1089,5476 (30)	1	Аралиясапонин III
23	5,1	1117,5419	1117,5436	$C_{54}H_{85}O_{24}$	959,3599 (15), 749,4479 (10), 793,4357 (35), 866,4649 (15), 919,4631 (7), 937,4834 (50), 955,4900 (51), 1013,5322 (47), 1057,5603 (36), 1099,5340 (55), 1117,5419 (100)	1,5	Календулагликозид А
24	4,0	1119,5585	1119,5593	$C_{54}H_{87}O_{24}$	609,3126 (10), 775,4263 (5), 955,4899 (7), 1087,5365 (3), 1119,5585 (100)	0,7	Аралиясапонин IV
25	3,4	1249,5862	1249,5859	$C_{59}H_{93}O_{28}$	763,4331 (10), 795,4525 (11), 925,4817 (100), 1249,5862 (95)	- 0,2	Аралияармозид

ПРИЛОЖЕНИЕ 3
АКТЫ ВНЕДРЕНИЯ И АПРОБАЦИИ



УТВЕРЖДАЮ

Директор ММБИ РАН

д.б.н. М.В. Макаров

2024 г.

АКТ АПРОБАЦИИ

Предмет апробации: методика проведения экстракции с использованием природных глубоких эвтектических растворителей для извлечения биологически активных веществ из корней аралии манчжурской.

Автор методики: Калета Алёна Алексеевна, соискатель ученой степени кандидата фармацевтических наук по научной специальности 3.4.1. промышленная фармация и технология получения лекарств

Место апробации: лаборатория зообентоса Мурманского морского биологического института Российской академии наук

Цель апробации: подтверждение воспроизводимости и практическое применения методики проведения экстракции с использованием природных глубоких эвтектических растворителей для извлечения биологически активных веществ из корней аралии манчжурской.

Результаты апробации: Результаты диссертационного исследования, а именно методика проведения экстракции с использованием природных глубоких эвтектических растворителей для извлечения биологически активных веществ из корней аралии манчжурской с ультразвуковой обработкой (УЗТА-0,4/22-ОМ, Россия) апробированы в научно-исследовательской группе биохимии и технологии гидробионтов лаборатории зообентоса Мурманского морского биологического института Российской академии наук в период с 8 апреля по 30 апреля. Оптимальные временные и температурные режимы проведения процесса подтверждены.

Заведующий лабораторией зообентоса,
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник ММБИ РАН

А.Г. Дворецкий

Подпись
заведующего
вед.специ.



Калета А.А.

УТВЕРЖДАЮ
Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ
Минздрава России
д.фарм.н. профессор


« 23 » 2024 г.

И.А. Титович

**Акт внедрения
результатов научно-практической работы
в научно-исследовательский процесс**

Комиссия в составе:

Председателя	проректора по научной работе, д-р фармацевт. наук, профессора	Е.В. Флисюк
и членов комиссии	старшего научного сотрудника департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. фармацевт. наук директора департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук, доцента	К.О. Сидорова И.А. Титович

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «12» марта 2021 г. № 100, составила акт о нижеследующем:

Результаты диссертационного исследования Калеты Алёны Алексеевны на тему «Природные глубокие эвтектические растворители в технологии экстрагирования аралии маньчжурской (*Aralia mandshurica*)», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, использовано в научно-исследовательской деятельности кафедр технологии лекарственных форм, промышленной технологии лекарственных препаратов ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках применения разработанной методики извлечения с помощью природных глубоких эвтектических растворителей и виброкавитационного гомогенизатора для интенсификации процесса.

Председатель	проректор по научной работе, д-р фармацевт. наук, профессор		Е.В. Флисюк
члены комиссии	старший научный сотрудник департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. фармацевт. наук директор департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук, доцент	 	К.О. Сидоров И.А. Титович