

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

БЕЛОВ ПАВЕЛ ВИКТОРОВИЧ

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАШТАНА
КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО (*AESCULUS HIPPOCASTANUM L.*)
КАК ПЕРСПЕКТИВНОГО ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук,
профессор В.А. КУРКИН

Самара – 2020

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ И ПРИМЕНЕНИЯ СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	17
1.1. Каштан конский обыкновенный – перспективный источник получения биологически активных соединений и лекарственных растительных препаратов.....	17
1.1.1. Этимология названия растения и историческая справка	18
1.1.2. Таксономия рода <i>Aesculus</i>	20
1.1.3. Ботаническое описание растения	21
1.1.4. Ареал каштана конского	22
1.1.5. Общехозяйственное применение.....	23
1.2. Лекарственное растительное сырье	24
1.2.1. Заготовка и сушка сырья	25
1.2.2. Внешние признаки сырья	25
1.2.3. Химический состав различных органов каштана конского обыкновенного.....	26
1.2.4. Фармакологические свойства препаратов на основе сырья каштана конского обыкновенного	34
1.3. Лекарственные препараты на основе каштана конского обыкновенного	38
1.4. Проблемы стандартизации сырья и препаратов каштана конского обыкновенного	46
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1.	48
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
2.1. Объекты исследования.....	50
2.2. Методы исследования	52
2.2.1. Методики морфолого-анатомического анализа.....	52
2.2.2. Химические методы анализа.....	52
2.2.3. Хроматографические методы анализа	53
2.2.4. Физико-химические методы анализа	55

2.2.5. Технологические методы.....	55
2.2.6. Микробиологические методы анализа.....	58
2.2.7. Фармакологические методы анализа	58
ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОРГАНОВ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО	60
3.1. Морфолого-анатомическое исследование семян каштана конского обыкновенного методом люминесцентной микроскопии	61
3.2. Изучение петиолярной анатомии листьев каштана конского обыкновенного	69
3.3. Морфолого-анатомическое исследование почек каштана конского обыкновенного	75
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3.	81
ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОРГАНОВ КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО	84
4.1. Сравнительное изучение надземных органов каштана конского обыкновенного	84
4.2. Выделение индивидуальных веществ из почек каштана конского обыкновенного	86
4.3. Идентификация выделенных индивидуальных веществ.....	87
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4.	93
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ПОЧЕК КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО	94
5.1. Разработка методик качественного анализа почек каштана конского обыкновенного	94
5.1.1. Качественный анализ почек каштана конского обыкновенного методом тонкослойной хроматографии.....	95
5.1.2. Качественный анализ почек каштана конского обыкновенного методом УФ-спектрофотометрии.....	96
5.2. Разработка методик количественного анализа почек каштана конского обыкновенного	97

5.2.1. Количественное определение суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного методом дифференциальной спектрофотометрии	98
5.2.2. Количественное определение рамноцитрина в почках каштана конского обыкновенного методом ВЭЖХ.....	105
5.3. Определение числовых показателей для нового вида лекарственного растительного сырья «Каштана конского обыкновенного почки»	112
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5.	114
ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО	115
6.1. Определение антимикробной и противогрибковой активности водно-спиртовых извлечений из почек и цветков каштана конского обыкновенного	115
6.2. Определение антимикробной активности извлечений из почек и цветков каштана конского обыкновенного в отношении штаммов, сопутствующих муковисцидозу	120
6.3. Определение влияния настойки почек каштана конского обыкновенного на выделительную функцию почек	126
6.4. Определение острой токсичности настойки почек каштана конского обыкновенного	126
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6.	127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	129
Список сокращений, использованных в диссертации.....	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	134
ПРИЛОЖЕНИЯ	147
Приложение 1. Акты о внедрении результатов диссертационного исследования	148
Приложение 2. Патент на изобретение «Способ получения вещества, обладающего противогрибковой активностью»	155
Приложение 3. Проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Каштана конского обыкновенного почки»	156

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В настоящее время фармацевтическая отрасль Российской Федерации следует положениям разработанной Стратегии развития фармацевтической промышленности в Российской Федерации до 2030 г. Согласно данным положениям, основными задачами фармацевтической промышленности являются импортозамещение, которое заключается в разработке и создании отечественных лекарственных средств с полным циклом производства в стране, а также увеличении экспорта лекарственных препаратов отечественного производства на фармацевтические рынки других стран.

В рамках данных положений необходимо отметить тот факт, что в настоящее время в ходе разработки и создания новых лекарственных средств большое внимание уделяется использованию лекарственного растительного сырья (ЛРС) (Куркин В.А., 2014; Самылина И.А. и др., 2008; Martins Ekor, 2014). Это связано с тем, что лекарственные растительные препараты (ЛРП) при рациональном использовании имеют ряд преимуществ перед средствами синтетического происхождения: меньший риск появления побочных эффектов, большая широта терапевтического действия, достаточная эффективность действия при сравнительной безопасности, а также часто более низкая стоимость (Куркин В.А., 2016; Самбукова Т.В. и др., 2017; Pal S.K., 2003).

Кроме того, одной из актуальных проблем современной фармакогнозии является комплексное использование лекарственных растений на основании ресурсосберегающих технологий. Перспективным в плане комплексного использования растением является каштан конский обыкновенный (*Aesculus hippocastanum* L.). Конский каштан имеет достаточно широкое распространение на территории Российской Федерации и находит свое применение как в официальной, так и в народной медицине (Богачев В.Ю., 2004; Вандышев В.В., 2002; Куцик Р.В., 2002). Классической сферой

применения препаратов каштана является терапия хронической венозной недостаточности (ХВН). Каштан конский обладает антиоксидантным, сосудоукрепляющим, противоотечным, противовоспалительным действием (Богачев В.Ю., 2004; Кияшко В.А., 2002; Корнюшин В.И., 2014; Куцик Р.В., 2002, Раскин И.М., 1982). Известно также антимикробное, противогрибковое, противоопухолевое действие экстрактов различных органов каштана конского (Керимов Ю.Б., 2005; Celep A.G.S., 2012; Güney G. et al., 2013; Mojžišová, G. et al., 2013).

Для изготовления лекарственных растительных препаратов используются семена растения, в производстве косметических средств и в народной медицине – листья, кора и цветки каштана конского обыкновенного. При этом официально не находит применения значительная часть фитомассы растения, что связано с недостаточной степенью изученности химического состава, фармакологической активности, а также отсутствием методик стандартизации сырья. Использование всей фитомассы конского каштана будет способствовать расширению сырьевой базы для создания лекарственных средств растительного происхождения, а также обеспечит вклад в решение проблем комплексной переработки этого растения и безотходного использования природных ресурсов.

В настоящее время ведутся исследования по определению химического состава и возможности применения в качестве лекарственного растительного сырья листьев и цветков каштана конского (Половко Н.П. и др., 2005; Постоюк Н.А., 2013; Mojžišová, G. et al., 2013; Wang, Y.-W. et al., 2012), экзокарпия плодов (Керимов Ю.Б., 2005). При этом без внимания остаются почки каштана конского, являющиеся перспективным источником биологически активных соединений (Куцик Р.В., 2002). Учитывая данные факты, представляется актуальным изучение в качестве нового перспективного вида ЛРС - почек каштана конского обыкновенного. Также целесообразно углубленное исследование других органов каштана конского с целью уточнения и

дополнения имеющихся в литературе данных о химическом составе, морфологических признаках и фармакологическом действии.

Степень разработанности темы. В настоящее время фармакопейные статьи (ФС) на сырье каштана конского обыкновенного в Государственной Фармакопее Российской Федерации XIV издания отсутствуют. При этом имеется ФС 2.6.0052.18 «Эскулюс гиппокастанум (Эскулюс). Настойка гомеопатическая матричная», распространяющаяся на гомеопатическую матричную настойку из свежих семян каштана конского обыкновенного. Данная статья регламентирует числовые показатели препарата и описывает методики качественного и количественного определения β -эсцина в настойке. Качественное определение проводится с помощью цветных пробирочных реакций и методом ТСХ в присутствии стандартного образца β -эсцина. Количественное определение β -эсцина осуществляется методом ВЭЖХ.

Отечественными учеными был проведен ряд исследований по изучению и стандартизации семян каштана конского (Жарова О.Г. и др., 2009; Шемерянкина Т.Б. и др., 2012), в ходе которых определены диагностически значимые анатомо-морфологические признаки семени каштана, изучен качественный и количественный химический состав, разработана методика количественного определения эсцина в семенах. На основании полученных данных разработаны и утверждены ТУ 9377-075-04868244-2008 «Конского каштана обыкновенного семени». Однако в данных работах не использовалась люминесцентная микроскопия, которая позволяет определять локализацию БАС, что актуально в плане определения подлинности ЛРС.

Рядом отечественных и зарубежных ученых проведено изучение листьев каштана конского и экстракта на их основе (Постоюк Н.А. и др., 2013; Половко Н.П. и др., 2005). В ходе данных исследований определены диагностически значимые признаки листьев, их качественный и количественный химический состав. Разработаны методики количественного определения суммы тритерпеновых сапонинов, фенольных соединений, флавоноидов. На

основании полученных данных разработаны и утверждены ТУ 9363-178-04868244-2013 «Каштана конского обыкновенного листа», однако в разделе «Микроскопические признаки» отсутствует описание анатомо-морфологических признаков черешка листа каштана конского, которые являются значимыми для определения подлинности ЛРС.

Таким образом, исследования в области стандартизации лекарственного растительного сырья каштана конского обыкновенного, в том числе, почек являются актуальными.

Цель работы и основные задачи исследования. Целью диссертационного исследования является фармакогностическое исследование каштана конского обыкновенного в рамках поиска новых видов лекарственного растительного сырья.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Анатомо-морфологическое исследование почек, семян и черешков листьев каштана конского, выявление диагностически значимых признаков.
2. Сравнительное фитохимическое исследование коры, цветков, почек, семян, экзокарпия плодов каштана конского обыкновенного, а также изучение флавоноидного состава почек каштана конского обыкновенного.
3. Разработка методик качественного анализа почек каштана конского обыкновенного с использованием методов тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).
4. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного с использованием спектрофотометрии.
5. Разработка методики количественного определения рамноцитрина в почках каштана конского обыкновенного с использованием ВЭЖХ.

6. Определение показателей качества для нового вида ЛРС «Каштана конского обыкновенного почки».

7. Научное обоснование целесообразности создания лекарственных растительных препаратов на основе почек каштана конского обыкновенного.

8. Разработка проекта фармакопейной статьи (ФС) на новый вид лекарственного растительного сырья – «Каштана конского обыкновенного почки».

Научная новизна. Морфолого-анатомическое исследование семян каштана конского позволило дополнить уже имеющиеся сведения о характерных особенностях строения семян. Впервые с использованием метода люминесцентной микроскопии определены диагностические признаки семян каштана конского, заключающиеся в особенностях люминесценции клеток эпидермы и проводящих пучков внутренней части семенной кожуры. Кроме этого, изучение петиолярной анатомии черешков листьев каштана конского позволило выявить диагностические признаки для данного вида сырья, которые заключаются в особенностях очертаний апикальной, медиальной и базальной части черешка, характере кутинизации эпидермы, особенностях свечения в ультрафиолете кутина и протопласта, характере опушения и армирования проводящих пучков. Изучение морфолого-анатомического строения почек каштана конского позволило выявить диагностически значимые признаки, заключающиеся в особенностях почкосложения и листосложения, наличии фрагментов примордиев и расположении проводящих пучков базальной части почки.

В ходе изучения химического состава почек каштана конского впервые для данного объекта выделены флавоноидные вещества – рамноцитрин и 7,4'-диметилкемпферол, химическая структура которых установлена с использованием методов УФ-спектрофотометрии, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Научно обоснованы методики качественного и количественного анализа флавоноидных соединений в почках каштана конского. Предложенные методики количественного анализа основаны на спектрофотометрическом определении суммы флавоноидов в пересчете на рамноцитрин (не менее 1,0%) и определении содержания рамноцитрина путем высокоэффективной жидкостной хроматографии (содержание не менее 0,3%).

Научная новизна данного диссертационного исследования подтверждена патентом РФ на изобретение №2691997 «Способ получения вещества, обладающего противогрибковой активностью».

Теоретическая и практическая значимость. Разработаны методики для определения подлинности почек каштана конского обыкновенного методами УФ-спектрофотометрии и ТСХ, предполагающего использование стандартного образца лютеолина. Разработаны и научно обоснованы методики количественного определения суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного в пересчете на рамноцитрин методом дифференциальной спектрофотометрии и обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием стандартного образца рамноцитрина.

Определены показатели качества почек каштана конского обыкновенного, включая числовые (содержание суммы флавоноидов в пересчете на рамноцитрин не менее 1,0%, содержание рамноцитрина – не менее 0,3%). Разработан проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья - «Каштана конского обыкновенного почки».

Впервые выявлено наличие противогрибковой (в отношении *Candida albicans*) и умеренно выраженной противомикробной активности для препаратов на основе почек каштана конского.

Полученные в ходе диссертационного исследования результаты применяются в учебном и научном процессе в ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России на профильных кафедрах фармацевтического факультета,

в рабочих и производственных процессах ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ЗАО «Самаралектравы», ООО «Самарская фармацевтическая фабрика».

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования основывается на поиске и изучении литературных источников, содержащих информацию, посвященную фармакогностическому изучению каштана конского обыкновенного, определения степени разработанности и актуальности темы исследования. Согласно поставленным целям и задачам разработан план выполнения диссертационной работы, определены объекты и методы.

Объектами исследования являлись почки, листья, цветки и плоды каштана конского обыкновенного, собранные на территории Самарской, Пензенской и Ульяновской областей, а также водно-спиртовые извлечения, полученные на основе данных видов сырья. Исследование проводилось с применением методов цифровой и люминесцентной микроскопии, тонкослойной хроматографии, УФ-спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, колоночной хроматографии, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, цветных пробирочных и гистохимических реакций, фармакологических и микробиологических методов. Математическую обработку осуществляли в соответствии с ГФ РФ XIV издания.

Связь задач исследования с планами научных работ. Диссертационная работа выполнялась согласно тематическому плану научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (до 14.05.2019 «Комплексные исследования по разработке лекарственных средств природного и синтетического происхождения», № гос. регистрации 115042810034; с 14.05.2019 «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических

субстанций и лекарственных препаратов», № гос. регистрации АААА-А19-119051490148-7).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Результаты анатомо-морфологического исследования почек, семян, черешков листьев каштана конского обыкновенного.
2. Результаты исследования химического состава почек каштана конского обыкновенного.
3. Результаты разработки методик определения подлинности почек каштана конского обыкновенного.
4. Результаты разработки методик количественного анализа почек каштана конского обыкновенного.
5. Данные по определению показателей качества почек каштана конского обыкновенного.
6. Результаты исследования фармакологической активности водно-спиртовых извлечений из почек каштана конского обыкновенного.

Степень достоверности. Достоверность диссертационной работы подтверждена данными, полученными в ходе экспериментов с применением методов цифровой и люминесцентной микроскопии, тонкослойной хроматографии, УФ-спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, колоночной хроматографии, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, химических, фармакологических и микробиологических методов анализа.

Апробация работы. Результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на следующих конференциях различного уровня: XX Всероссийский конгресс «Экология и здоровье человека» (Самара, 2015); Аспирантские чтения (Самара, 2016, 2017, 2018, 2019); II Межвузовская научно-практическая конференция «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы» (Самара, 2017); 7-я Международная научно-методическая конференция «Фармообразование-2018» (Воронеж, 2018); XIII

научно-практическая конференция молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием «Медицинская наука: новые возможности» (Душанбе, 2018); XII Всероссийская (86-я Итоговая) студенческая научная конференция с международным участием «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты» (Самара, 2018); II Научно-практическая конференция студентов и молодых ученых научно-образовательного медицинского кластера «Нижеволжский» «Физика и медицина: создавая будущее» (Самара, 2018); IV Гаммермановские чтения (С.-Петербург, 2019); Третья Международная научная конференция «Наука будущего» и четвертый Всероссийский молодежный научный форум «Наука будущего - наука молодых» (Сочи, 2019); II Международная научная конференция «Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства» (Москва, 2019).

Публикации. По теме диссертационного исследования имеется 22 публикаций, из которых 5 работ в изданиях, включенных в список рекомендуемых ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, и 2 статьи в изданиях, индексируемых в международных наукометрических базах (Scopus и Web of Science). Получен патент РФ на изобретение № 2691997 «Способ получения вещества, обладающего противогрибковой активностью».

Внедрение результатов исследования. Полученные в ходе диссертационного исследования результаты применяются в учебном и научном учебном процессе в ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России на профильных кафедрах фармацевтического факультета, в рабочих и производственных процессах ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ЗАО «Самаралектравы», ООО «Самарская фармацевтическая фабрика».

Личный вклад автора. Все результаты исследований, описанные в диссертационной работе, были получены автором. Автором исследовано морфолого-анатомическое строение почек, семян и черешков листьев каштана конского обыкновенного, выявлены характерные диагностические признаки для данных видов сырья.

Проведено сравнительное фитохимическое исследование почек, коры, семян, цветков каштана конского обыкновенного. Из почек растения выделено и идентифицировано два индивидуальных соединения флавоноидной природы, разработаны и обоснованы методики качественного и количественного определения для почек каштана конского обыкновенного с использованием методов тонкослойной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии и УФ-спектрофотометрии. Изучена противогрибковая и антимикробная активность жидких экстрактов на основе сырья каштана конского обыкновенного. Определена острая токсичность настоек почек каштана конского. Разработан проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Каштана конского обыкновенного почки».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные положения, описанные в диссертационном исследовании, соответствуют паспорту научной специальности 14.04.02 - «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пунктам 2, 3, 6.

Объем и структура работы. Общий объем диссертационной работы составляет 146 страниц машинописного текста, на которых изложены ход и результаты исследования. Данные представлены в виде 26 таблиц и проиллюстрированы на 46 рисунках. Работа включает в себя введение, литературный обзор, объекты и методы исследования, 6 глав, представляющих результаты исследований, выводы и заключение, список литературы, состоящий из 115 источников, из которых 27 - на иностранном языке.

Введение содержит описание актуальности темы исследования, цели и задачи, научную новизну и практическую значимость исследования, основные положения, выносимые на защиту, сведения о публикациях по теме исследования и апробации работы.

Глава 1 представляет собой обзор литературных источников отечественных и иностранных авторов в области фармакогностических исследований каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.). В главе подробно описаны данные, касающиеся ареала, химического состава, подходов к стандартизации семян и листьев каштана конского.

Глава 2 включает описание объектов и методов исследования.

Глава 3 посвящена результатам морфолого-анатомического исследования почек, семян, черешков листьев каштана конского обыкновенного, в том числе с использованием метода люминесцентной микроскопии.

В главе 4 описаны результаты сравнительного фитохимического исследования почек, семян, коры, цветков каштана конского обыкновенного, приведены результаты выделения индивидуальных соединений из почек каштана конского, данные по их химическому строению.

Глава 5 посвящена разработке методик качественного и количественного анализа почек каштана конского обыкновенного с использованием ТСХ, УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

Глава 6 содержит результаты исследования противогрибковой и противомикробной активности, исследования диуретической активности и острой токсичности жидких экстрактов и настоек на основе сырья каштана конского обыкновенного.

Диссертационная работа завершается заключением, выводами, практическими рекомендациями, описанием перспектив дальнейших исследований и списком литературы.

В приложениях к диссертации представлены акты внедрения, патент РФ № 2691997 «Способ получения вещества, обладающего противогрибковой активностью», проект ФС «Каштана конского обыкновенного почки».

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ СТАНДАРТИЗАЦИИ И ПРИМЕНЕНИЯ СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Каштан конский обыкновенный издавна широко применялся в народной и научной медицине, однако официальным лекарственным растительным сырьем в Российской Федерации являются только семена данного растения. В настоящее время каштан конский активно исследуется в плане создания лекарственных средств, как правило, обладающих ангиопротекторной активностью [107]. Однако официально используются лишь некоторые органы растения, что дает возможность изучения и введения в практическую фармацию новых видов лекарственного растительного сырья на основе каштана конского обыкновенного.

1.1. Каштан конский обыкновенный – перспективный источник получения биологически активных соединений и лекарственных растительных препаратов

Перспективность изучения каштана конского как источника сырья для создания лекарственных препаратов обусловлена его богатым химическим составом. В настоящее время на фармацевтическом рынке РФ имеется ряд лекарственных препаратов на основе каштана, однако следует отметить, что большинство из них – препараты зарубежного производства [61]. В России только семена каштана конского являются официальным сырьем, что обуславливает актуальность фармакогностического изучения других частей растения, представляющих большой интерес с точки зрения комплексного использования каштана конского обыкновенного в рамках создания новых эффективных и безопасных отечественных лекарственных растительных препаратов [95, 73, 44, 72].

1.1.1. Этимология названия растения и историческая справка

Конский каштан обыкновенный (лат. *Aesculus hippocastanum* L.) — крупное лиственное дерево, широко известное как и на территории России, так и в мире с давних времен [6, 29].

Родовое наименование *Aesculus* происходит от названия вечнозеленого дуба (лат. *esca* – еда), которое дано дубу из-за съедобных плодов. Название вида *A. hippocastanum* - от греческого *hippos* - лошадь и латинского *castanea* – настоящий каштан, названного в честь города Kastana, в котором греки впервые стали сажать и выращивать это дерево [47]. Название растения — *Aesculus hippocastanum* — можно перевести с латыни как «дуб конскокаштановый» [11, 29].

Само название «конский каштан» происходит от схожести цвета скорлупы плодов со съедобным каштаном *Castanea sativa* Mill. семейства Буковые (*Fagaceae*) [40, 103]. Другой вариант происхождения названия подразумевает напоминающие по форме лошадиную подкову листовые рубцы, остающиеся на побегах после листопада [40].

Также существует и иная версия, гласящая, что семена этого растения были привезены турками в Центральную Европу как корм для лошадей и использовались как лекарство от лошадиного кашля, что имеет подтверждение в исторических данных [47]. Для отличия от съедобных каштанов они были названы конскими [47, 96, 110].

Первое упоминание о применении каштана конского обыкновенного появилось в 1556 году. Доктор П. А. Маттиоли (1500–1577) советовал кормить страдающих от одышки лошадей плодами каштана [52, 99]. С 1575 г. года каштан конский стал выращиваться в Вене, куда его привез из Турции ботаник Клаузиус. В 1615 году каштан появился во Франции, через 200 лет - в Америке.

С середины XIX века каштан конский обыкновенный стал применяться для озеленения городов на территории бывшего СССР. В то время среди некоторых ботаников бытовало мнение о происхождении растения из Индии,

данный факт нашел отражение во французском названии каштана конского — «Marronnier d'Inde». Гораздо позже было установлено, что на самом деле каштан происходит из горных лесов Балканского полуострова. [48].

Каштан конский применялся и в других аспектах жизни человека. Американские индейцы готовили и использовали в пищу семена каштана, ядовитые в необработанном виде, изготавливая из них муку [105]. Проросшие семена, в которых содержится большое количество полисахаридов, использовали для приготовления солода; кожуру семени использовали в качестве наркотика, сравнимого с опиумом; порошком из семян и ветвей травили рыбу [48, 105].

Конский каштан обыкновенный издавна используют для приготовления лекарств [7, 11, 33, 80]. Имеются данные о целебности его коры, семян и даже их твердой оболочки, а также цветков и листьев. Из литературы известно, что отвар из коры этого растения использовали как противолихорадочное и жаропонижающее средство, а также при хронических поносах, геморрое [7, 11]. Отвар из измельченной оболочки семян, настой из цветков применяли при расширении вен, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, болезнях печени, простуде [7]. Жирное масло из очищенных семян помогало лечить больные суставы. Есть наблюдения, что людям, страдающим суставным ревматизмом, можно снять болезненные симптомы путем прикладывания семян конского каштана, сложенных в мешочек, к пояснице или на болезненный сустав [7].

В Европе XVIII-XIX вв. порошки плодов и коры конского каштана использовали в лечении малярии, лихорадок и дизентерии [76, 78]. Каштан позиционировался как замена коре хинного дерева, которая была дорогой и не всегда доступной. Особую популярность в этом качестве каштан конский получил во Франции при Наполеоне II в период изоляции страны и ограничения ввоза коры хинного дерева [48]. Однако препараты на основе каштана уступали классическим средствам для лечения малярии, поэтому применялись недолго [48].

Позднее стали появляться свидетельства об эффективности каштана конского в лечении заболевания сосудов и нарушений кровообращения. Порошком из семян обрабатывали варикозные язвы, отвар использовали при лечении геморроя, настойка применялась в терапии геморроя, подагры, хронических колитов [48].

В научно-практической медицине каштан конский появился в конце XIX века благодаря французскому врачу А. Арто де Веве. В 1896 г. он опубликовал свои работы и наблюдения, посвященные успешной терапии геморроя и варикозных проявлений настойкой каштана [48]. Кроме того, каштан конский считался эффективным средством для лечения простатитов и аденомы простаты (Леклерк). Широкое использование и промышленное производство венотоников на основе каштана конского началось в середине XX века в Германии [48].

1.1.2. Таксономия рода *Aesculus*

Конский каштан обыкновенный (*Aesculus hippocastanum* L.) принадлежит к роду Конский каштан (*Aesculus* L.), относящемуся к семейству Конскокаштановые (*Hippocastanaceae* A.Rich.) [47]. В некоторых зарубежных источниках род *Aesculus* относят к подсемейству *Hippocastanoideae* Burnett семейства Сапиндовые (*Sapindaceae* Juss.), что связано, очевидно, с генетическим родством данных семейств [27, 47, 98].

Следует отметить, что, несмотря на присутствие в общепринятом названии слова «каштан», конские каштаны не связаны с родом Каштан (*Castanea* Mill.), который относится к семейству Буковые (*Fagaceae* Dumort. nom. Cons.) [101].

Видовой эпитет «обыкновенный» помогает отличить *Aesculus hippocastanum* L. от других видов рода *Aesculus* [97]:

- *Aesculus assamica* Griff. — Конский каштан ассамский;
- *Aesculus californica* (Spach) Nutt. — Конский каштан калифорнийский;
- *Aesculus* ×*carnea* Hayne — Конский каштан мясо-красный;

- *Aesculus chinensis* Bunge — Конский каштан китайский;
- *Aesculus flava* Sol. — Конский каштан жёлтый;
- *Aesculus glabra* Willd. — Конский каштан голый (конский каштан гладкий);
- *Aesculus indica* (Wall. ex Cambess.) Hook. — Конский каштан индийский;
- *Aesculus* ×*neglecta* Lindl. — Конский каштан незамеченный;
- *Aesculus parviflora* Walter — Конский каштан мелкоцветковый;
- *Aesculus pavia* L. — Конский каштан красный (конский каштан павия);
- *Aesculus* ×*plantierensis* André — Конский каштан французский;
- *Aesculus sylvatica* W.Bartram — Конский каштан лесной;
- *Aesculus turbinata* Blume — Конский каштан японский [97].

1.1.3. Ботаническое описание растения

Конский каштан обыкновенный – листопадное дерево высотой до 30 м, имеющее хорошо развитую корневую систему и широкую густую крону [47, 49] (рис. 1).

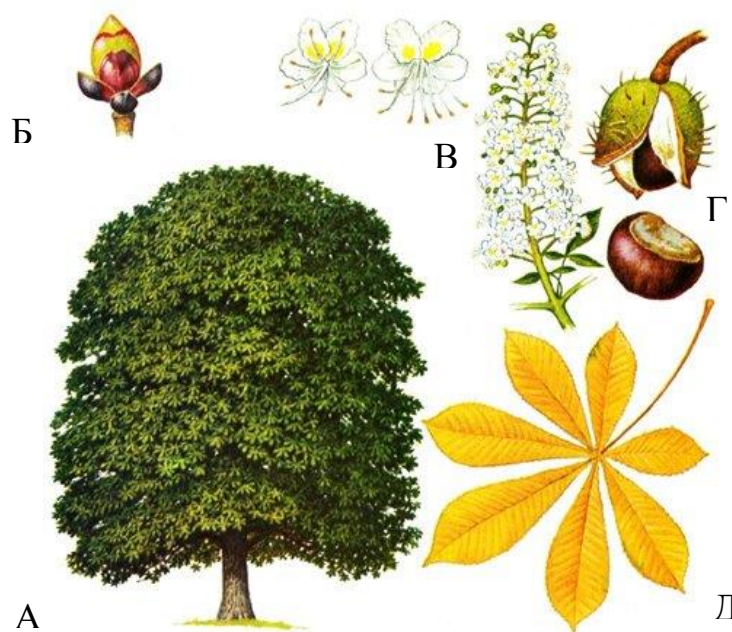


Рисунок 1 - Внешний вид дерева каштана конского обыкновенного и его морфологических органов: А – общий внешний вид дерева каштана конского; Б – почки на побеге; В – соцветие и цветки; Г – плод и семя; Д – лист [86].

Кора ствола темно-коричневая, трескающаяся; старые ветви коричневато-серые, молодые побеги коричневые, голые [47]. Листья супротивные, черешковые, имеют округлую форму. Размер листьев варьирует от 20 до 25 см в диаметре. Листья пальчато-сложные, с 5-7 сидячими листочками клиновидной формы, заостренными на вершине. Край листа неравномерно-двойкопильчатый. Листья имеют темно-зеленую окраску с верхней стороны, нижняя поверхность листьев бледнее, имеет рыжее опушение вдоль жилок. Раздельнолепестные зигоморфные цветки сгруппированы в крупные конические метелки, имеющие длину до 30 см. Венчик белого цвета с желтоватым или красноватым пятном. Плод - круглая трехстворчатая коробочка до 6 см в диаметре, зеленого цвета, на поверхности имеет крупные шипы. Внутри коробочки - коричневое блестящее семя, имеющее крупное серое пятно у основания [47].

Цветет конский каштан в конце весны (май-июнь); период плодоношения приходится на середину осени (сентябрь-октябрь) [47].

1.1.4. Ареал каштана конского

Конский каштан в дикой природе встречается как реликт в горных лесах Балканского полуострова, являющиеся его родиной [48, 47]. Терпимый к тени, хорошо растет на глинистых или илисто-песчаных почвах, довольно влажных, но без чрезмерной влажности. Хорошо переносит достаточно сухие черноземные почвы в степной зоне и не переносит засоленных почв. Растение чувствительно к суховеям, поэтому летом листья часто обгорают и преждевременно опадают. Устойчив к условиям зимы средней полосы европейской части России. На широтах Москвы и Санкт-Петербурга при низких температурах подмерзает, особенно молодая поросль; в защищенных местах может вырастать в крупные деревья с обильным цветением [7, 48, 47].

В благоприятных условиях конский каштан может достигать возраста 200-300 лет. Он широко культивируется как декоративное растение в ряде

стран СНГ, в том числе в Российской Федерации (рис. 2), в республиках Средней Азии, в том числе на юге Казахстана [48].

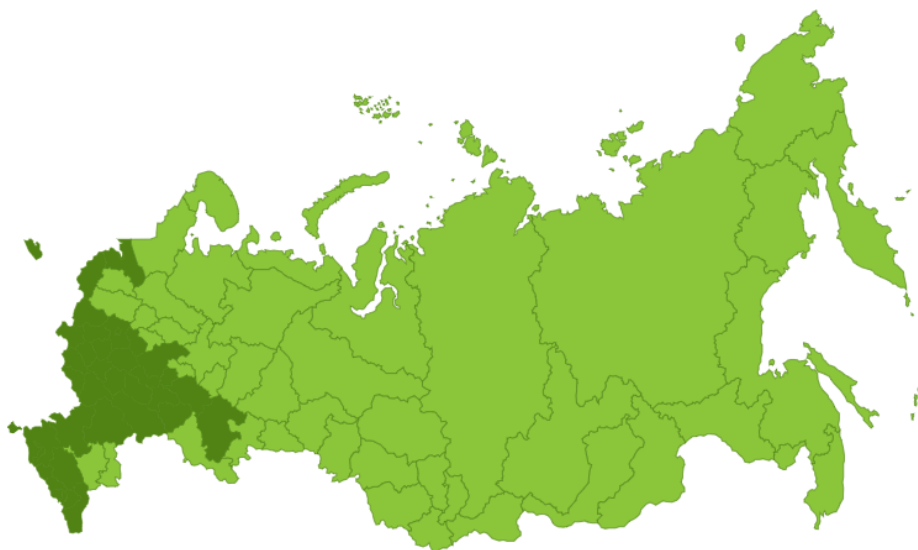


Рисунок 2 - Регионы распространения каштана конского обыкновенного на карте России [51].

1.1.5. Общехозяйственное применение

Каштановые леса выполняют почвозащитные, водоохранительные и санитарные функции [22, 86]. Древесина растения не имеет большой коммерческой ценности из-за своей мягкости и низкой устойчивости [40]. На воздухе быстро темнеет, приобретая серый цвет, из-за чего изделия из древесины каштана требуют защиты поверхности. Однако ввиду того, что древесина каштана достаточно вязкая и хорошо удерживает в себе крепежные элементы (гвозди, шурупы и т. д.), а также хорошо склеивается и окрашивается, ее возможно использовать для изготовления дверных полотен и мебели [86]. Древесина каштана конского хорошо подвергается резанию и механической обработке поверхности, в связи с чем каштан находит применение в создании мелкой домашней утвари, различной тары (ящики, бочки, хьюмидоры, кيسеты для хранения табака), деревянных поделок. Также в из древесины растения изготавливали музыкальные инструменты, обувь и

ортопедические протезы [40].

Экстракт, приготовленный из коры, используют для дубления кожи, окраски хлопчатобумажных, шерстяных и шелковых тканей в темно-коричневый и оливковый цвет. Из молодых ветвей плетут корзины [7].

Каштан конский – прекрасный медонос. Нектар каштана содержит 65-75% сахара, мед жидкий, прозрачный, обычно бесцветный, быстро кристаллизуется [40, 48].

Сушеные плоды использовали для изготовления переплетного клея. Книжки, переплетенные с использованием такого клея, отличались длительным сроком хранения и меньше подвергались разрушению насекомыми [40, 48].

1.2. Лекарственное растительное сырье

К настоящему времени для производства значительных по разнообразию лекарственных и гомеопатических средств используют в основном семена (*Hippocastani semina*) и листья (*Hippocastani folia*), реже кору (*Hippocastani cortex*).

В Российской Федерации официально регламентируется использование сухого экстракта из семян каштана конского для промышленного производства лекарственных средств. Соответствующие нормативные документы были включены в государственный реестр РФ в 2008 году [79]. В производстве косметических средств используются также и листья каштана.

Каштан конский имеет применение в других странах и встречается в зарубежных фармакопеех; так, семена каштана конского описаны в Немецкой фармакопее [93], Британской Травяной Фармакопее [90], Французской фармакопее [108, 109] и Фармакопее США [111], кора каштана описана во Французской фармакопее [108, 109]. Также интересно отметить наличие статей на семена родственных видов *Aesculus chinensis* Bge, *Aesculus chinensis* Bge var. *chekiangensis* (Hu et Fang) Fang, *Aesculus wilsonii* Rehd. в ГФ Китайской Народной Республики [16].

1.2.1. Заготовка и сушка сырья

Созревшие семена конского каштана собирают с земли по мере их осыпания. Очищенные от околоплодников семена сушат на стеллажах слоями толщиной до 5 см, в этом случае сушка длится от 3 до 4 недель. При сушке в сушилках с температурой 40-60 °С семена высушиваются за 2-3 дня. Высушенные семена упаковываются в мешки по 20-30 кг. Доля непригодных (проросших и заплесневевших) семян должна быть не более 2,5%, примесей других частей растения не более 1%, минеральных примесей (земля, песок, камешки) не более 2,5% [47, 33].

Листья конского каштана можно собирать с момента их полного распускания до начала пожелтения, то есть с мая по сентябрь включительно. Если заготовка листьев проводится каждый год на одних и тех же деревьях, следует осуществлять сбор в конце лета, до листопада. Листья собирают вместе с черешками, вручную. Собранные листья складывают без уплотнения в открытую тару или в мешки и сразу транспортируют к месту сушки. Сушку проводят в сушилках, под навесами или в хорошо проветриваемых помещениях, выкладывая их слоем толщиной не более 10 см. В первые 2-3 дня для ускорения сушки листья периодически переворачивают. Сырье считается высушенным, если листовые черешки ломаются при сгибании [33]. Готовое сырье представляет собой цельные или частично изломанные, в той или иной степени смятые или сложенные листья. Сырье имеет зеленый цвет, запах слабый, приятный, вкус слегка вяжущий. Доля потемневших листьев в сырье не должна превышать 10%; доля остальных частей конского каштана не более 8%; влажность не более 12% [33].

1.2.2. Внешние признаки сырья

Семена. Крупные, округлые, слегка сплюснутые, часто плоские с одной стороны. Имеют бугристую поверхность, размер семян - до 2-4 см в диаметре. Кожура семени гладкая, блестящая, имеет темно-коричневый цвет. У

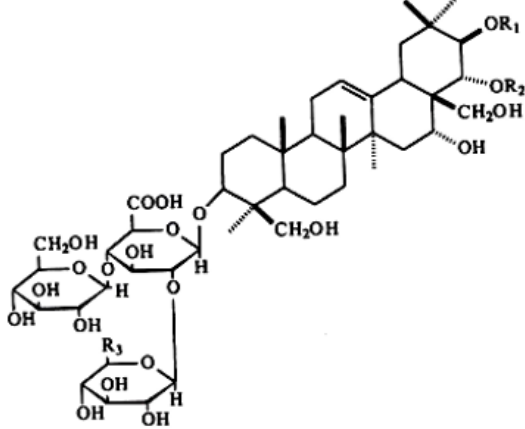
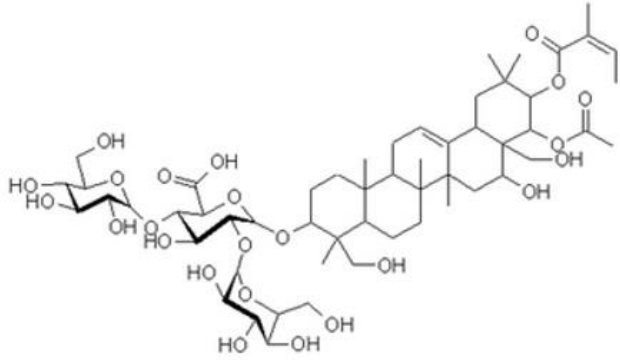
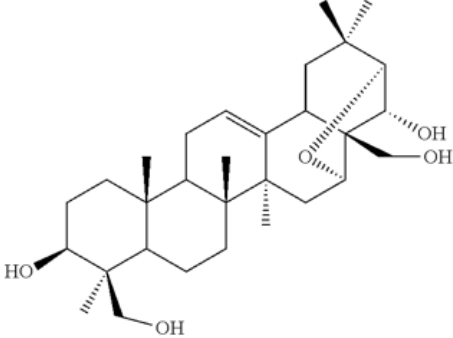
основания семени находится большое сероватое пятно. Запах отсутствует, вкус сырья сначала сладкий, затем горький [47]. Листья. Сырье цельное либо частично измельченное. Листья пальчатосложные. Листочки морщинистые, снизу заметны выступающие жилки. Длина листочков достигает 20-25 см, ширина - до 10 см. Черешки бороздчатые, коричневато-зеленые, длиной до 25 см. Сверху листья темно-зеленые, снизу более бледные, с красноватым опушением вдоль жилок и в местах соединения с черешком. Запах сырья слабый, приятный, вкус слегка вяжущий [47].

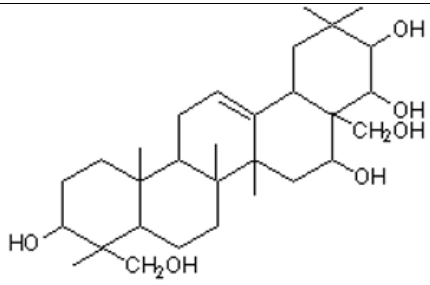
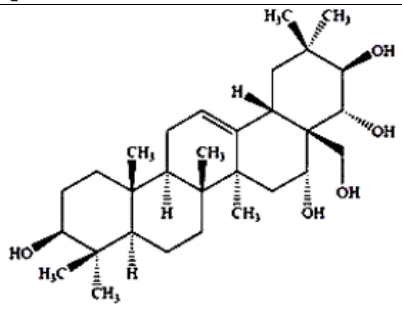
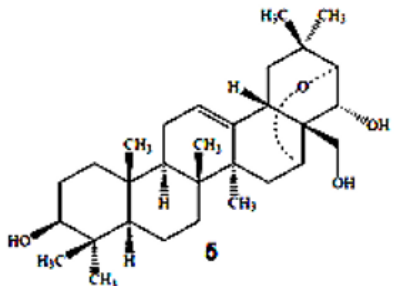
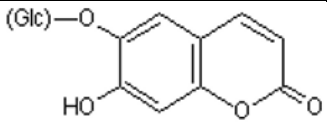
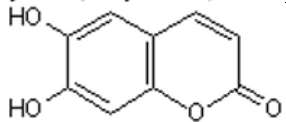
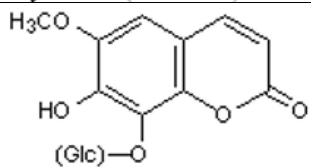
1.2.3. Химический состав различных органов каштана конского обыкновенного

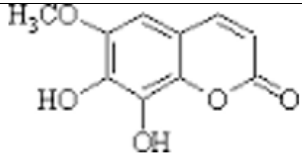
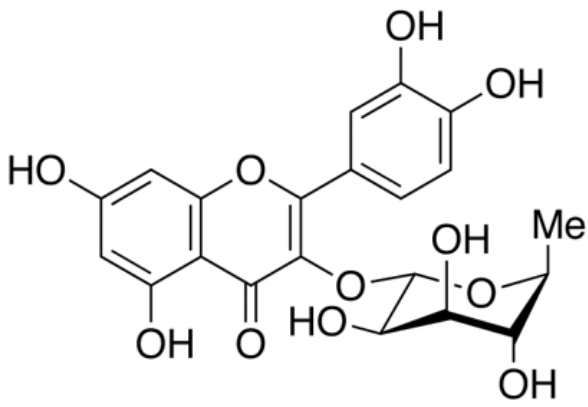
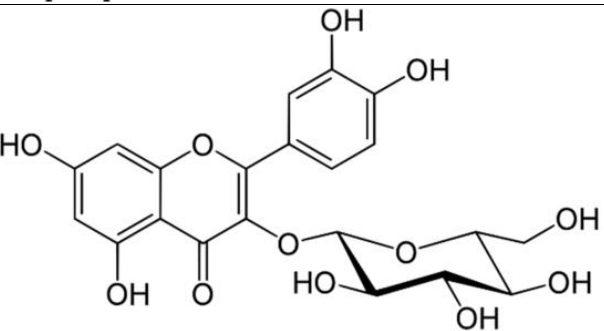
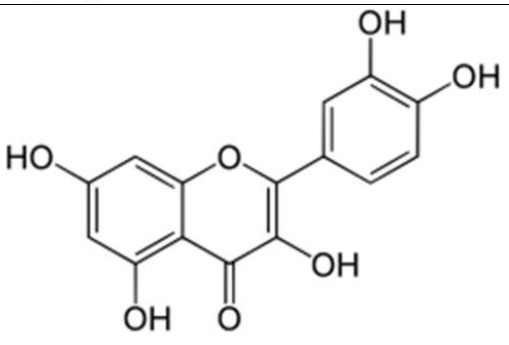
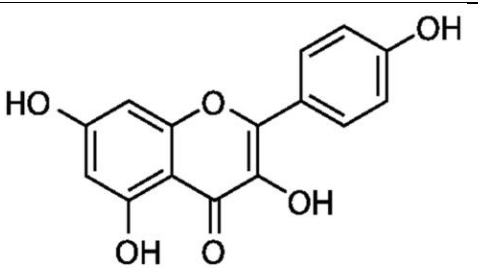
Фармакологические свойства плодов конского каштана связаны с содержанием в них кумаринов и оксикумаринов. Так, в плодах содержатся кумарины и оксикумарины, важным компонентом семян является тритерпеновый сапониновый гликозид эсцин, являющийся смесью α -эсцина, β -эсцина и криптоэсцина (известных также как эсцин Ia, Ib, IIa, IIb и IIIa) [31] и их агликаны (эсцигенин, протоэсцигенин, барингтогенины C и D) [48, 25]. Биологическая активность эсцина обусловлена β -эсцином [25].

Плоды каштана конского содержат около 0,13% флавоноидных гликозидов, около 0,9% дубильных веществ, 5-7% жирного масла, 11% белков, пектины, крахмал (до 49,5%) [25, 31, 48].

Таблица 1 - Химический состав плодов каштана конского обыкновенного

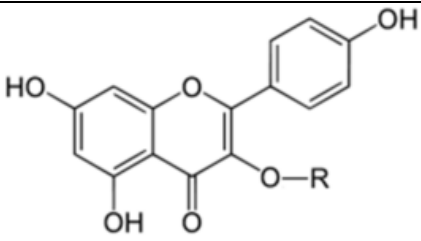
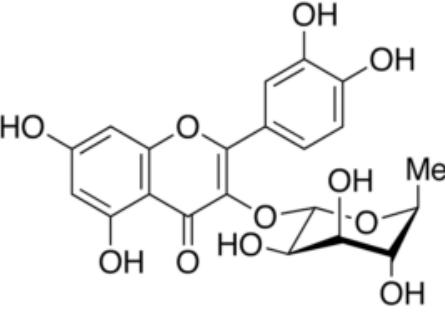
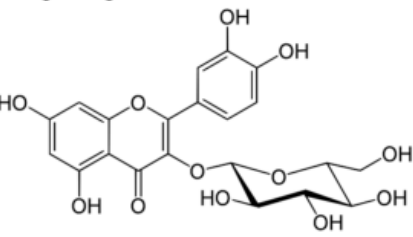
Биологически активные соединения	Литературный источник
<p style="text-align: center;">Сапонины</p>  <p>Эсцин:</p> <p>Эсцин Ia: R₁=тиглиновая кислота, R₂=ацетил, R₃=CH₂OH</p> <p>Эсцин Ib: R₁=ангеликовая кислота, R₂=ацетил, R₃=CH₂OH</p> <p>Дезацилэсцин I: R₁= R₂=H, R₃=CH₂OH</p> <p>Эсцин IIa: R₁=тиглиновая кислота, R₂=ацетил, R₃=H</p> <p>Эсцин IIb: ангеликовая кислота, R₂=ацетил, R₃=H</p> <p>Дезацилэсцин II: R₁= R₂= R₃=H</p>	25, 31, 48, 85
 <p>β-Эсцин</p>	25, 48, 47
 <p>Эсцигенин</p>	25, 48

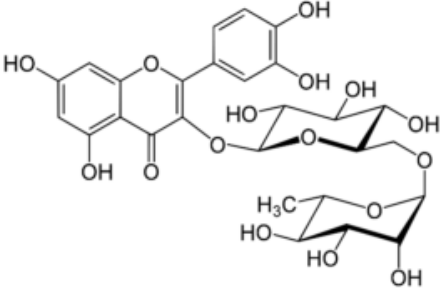
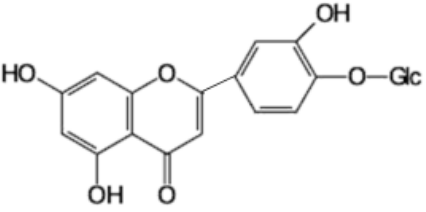
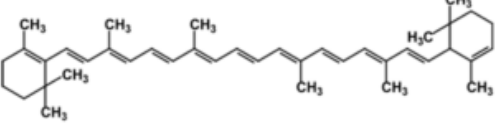
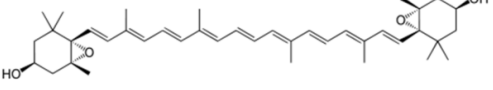
 <p>Протоэсцигенин</p>	25, 48
 <p>Баррингтогенин С</p>	25, 48
 <p>Баррингтогенин D</p>	25, 48
Кумарины	
 <p>Эскулин (эскулозид)</p>	25, 48, 47, 85
 <p>Эскулетин (эсцинол)</p>	25, 48, 47
 <p>Фраксин</p>	25, 48, 47, 85

 <p>Фраксетин</p>	25, 48, 47
Флавоноиды	
 <p>Кверцитрин</p>	25, 31, 48, 47, 85
 <p>Изокверцитрин</p>	25, 31, 48
 <p>Кверцетин</p>	25, 31, 48, 85
 <p>Кемпферол</p>	25, 31, 48

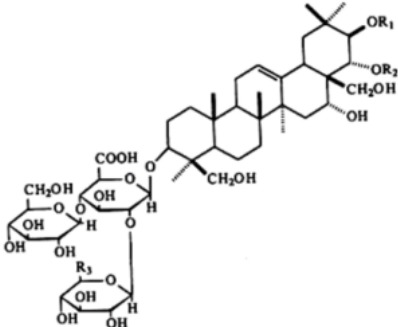
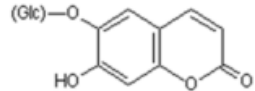
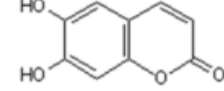
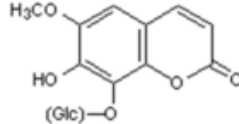
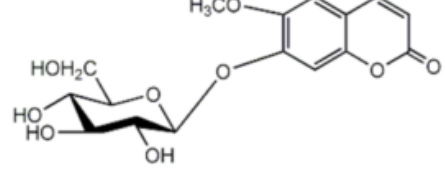
Цветки и листья каштана конского содержат вещества флавоноидной природы, производные кверцетина и кемпферола. В цветках каштана содержатся помимо флавоноидов полисахариды и дубильные вещества, в листьях присутствуют также полисахариды (пектины) и каротиноиды [48].

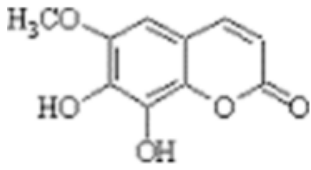
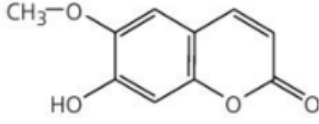
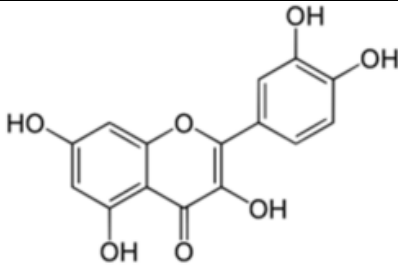
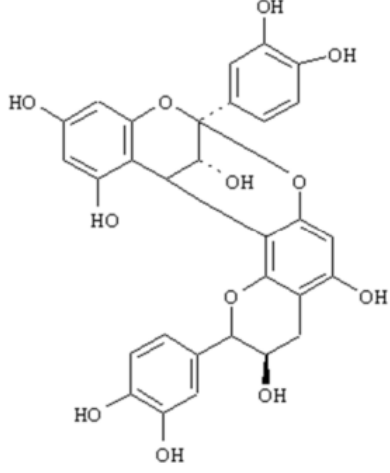
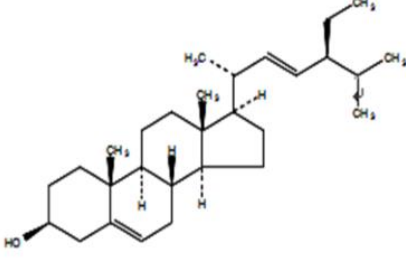
Таблица 2 - Химический состав цветков и листьев каштана конского обыкновенного

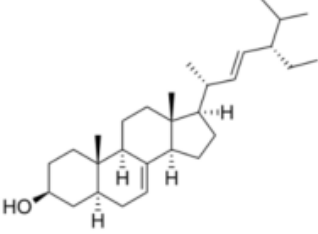
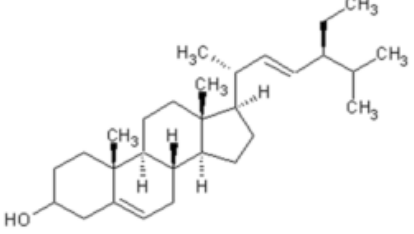
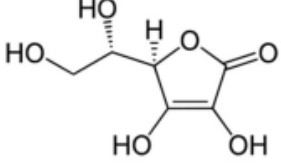
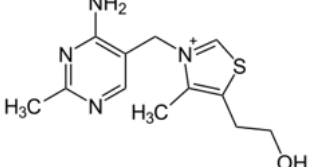
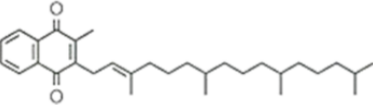
Биологически активные соединения	Литературный источник
Флавоноиды	
 <p>Кемпферол: R=H; 3-Глюкозид кемпферола: R=Glc; 3-Арабинозид кемпферола: R=Ara; 3-Рамноглюкозид кемпферола: R=Rhamn-O-Glc</p>	48, 47, 66
 <p>Кверцетрин</p>	48, 66, 47
 <p>Изокверцетрин</p>	48, 66, 47

 <p>Рутин</p>	48, 66, 47
 <p>Спиреозид</p>	48
<i>Каротиноиды</i>	
 <p>Лютеин</p>	25, 48
 <p>Виолаксантин</p>	25, 48

Кора каштана конского содержит кумарины, оксикумарины, дубильные вещества, фитостеролы, жирные масла (2,5-7%), полисахариды (9%), витамины [48].

Биологически активные соединения	Литературный источник
Сапонины	
 <p>Эсцин:</p> <p>Эсцин Ia: R₁=тиглиновая кислота, R₂=ацетил, R₃=CH₂OH</p> <p>Эсцин Ib: R₁=ангеликовая кислота, R₂=ацетил, R₃=CH₂OH</p> <p>Дезацилэсцин I: R₁= R₂=H, R₃=CH₂OH</p> <p>Эсцин IIa: R₁=тиглиновая кислота, R₂=ацетил, R₃=H</p> <p>Эсцин IIb: ангеликовая кислота, R₂=ацетил, R₃=H</p> <p>Дезацилэсцин II: R₁= R₂= R₃=H</p>	25, 31, 48
Кумарины	
 <p>Эскулин (эскулозид)</p>	25, 48, 47
 <p>Эскулетин (эсцинол)</p>	25, 48, 47
 <p>Фраксин</p>	25, 48, 47
 <p>Скополин</p>	25, 48, 47

 <p>Фраксетин</p>	48, 47
 <p>Скополетин</p>	48, 47
Флавоноиды	
 <p>Кверцетин</p>	25, 48, 47
Дубильные вещества	
 <p>Проантоцианидин-А2</p>	48
Фитостеролы	
 <p>Стигмастерол</p>	48

 <p>α-Спинастерол</p>	48
 <p>β-Ситостерол</p>	48
Витамины	
 <p>Аскорбиновая кислота (витамин С)</p>	48
 <p>Тиамин (витамин В₁)</p>	48
 <p>Филлохинон (витамин К)</p>	48

1.2.4. Фармакологические свойства препаратов на основе сырья каштана конского обыкновенного

Классическая область применения препаратов конского каштана - терапия хронической венозной недостаточности (ХВН) [5, 7, 48]. Лекарственные препараты из каштана обладают ангиопротекторным (капилляроукрепляющим) действием и используются при геморрое [42], варикозном расширении вен, а также венозном стазе, тромбофлебитах и трофических язвах нижних конечностей [5, 48, 21].

Хроническая венозная недостаточность является наиболее

распространенным заболеванием сердечно-сосудистой системы [5, 102]. Проявляется ХВН в виде застоя крови в области нижних конечностей и нарушении ее оттока. Данный синдром часто возникает как следствие варикозной болезни или тромбоза глубоких вен. Также причиной развития ХВН могут служить врожденные нарушения деятельности венозной системы [5, 68, 97].

По данным, представленным на XIV Всемирном конгрессе флебологов, в странах Европы и Северной Америке 25% трудоспособного населения страдают ХВН [5, 102]. Данные по Российской Федерации и Самарской области в частности позволили выявить также высокую степень заболеваемости (15% и 9% соответственно) [30, 81].

В третьем Базельском исследовании Widner показал, что возраст является наиболее важным фактором риска, т.к. заболевание встречается в 6–10 раз чаще среди лиц старше 70 лет в сравнении с людьми моложе 30 лет [5, 12, 102].

Причиной развития ХВН являются вызванные длительной венозной гипертензией нарушения в деятельности венозного русла нижних конечностей. Для устранения причины возникновения ХВН – венозной гипертензии - применяют эластичный компрессионный трикотаж, имеющий высокую эффективность и способный в краткие сроки нормализовать кровообращение в проблемных областях [36, 92]. При этом большое внимание уделяется фармакотерапии вкпе с применением трикотажа, а в случае начальных стадий заболевания позволяющей полностью отказаться от компрессионной терапии [68]. Основной группой лекарственных средств для системного лечения сосудистых заболеваний, независимо от их происхождения, являются ангиопротекторы [68]. Главным механизмом действия ангиопротекторов является нормализация структуры и функции сосудов, особенно вен. Данный эффект затрагивает все венозное русло, поэтому ангиопротекторы могут использоваться практически во всех областях

клинической медицины [5, 68].

Капилляропротективное и противоотечное действие большинства ангиопротекторов, применяющихся в мировой медицинской практике, имеют в составе различные вещества флавоноидной природы. Доказано, что флавоноиды препятствуют развитию тромбозов артерий и проявляют выраженный ангиопротекторный эффект в отношении не только артерий, но и вен [5, 68].

Помимо этого, широкое применение находят препараты, содержащие сапонины, производные эсцина, также обладающего ангиопротекторной активностью. Источником данных веществ является сырье каштана конского обыкновенного [5, 47].

Препараты конского каштана способствуют уменьшению отека и воспаления у пациентов с варикозным синдромом. Благодаря увеличению интенсивности кровотока ускоряется процесс очистки трофических язв голени, происходит рассасывание тромбов [48, 47]. Выраженное венотоническое действие препаратов каштана конского обеспечивает нормализацию кровотока, особенно венозного. Антиагрегантные и антикоагулянтные эффекты препаратов каштана определяют их эффективность в профилактике тромбозов. Противовоспалительные, противоотечные и капилляроукрепляющие свойства способствуют быстрому устранению клинических симптомов [48].

Согласно ряду авторов, экстракты на основе каштана конского обладают довольно выраженной антиоксидантной активностью [91, 99, 106, 113].

Celep A.G.S., Yilmaz S., Coruh N. показали, что наиболее значимым в данном направлении является использование этанольного экстракта коры каштана [91]. Антиоксидантная способность каждой надземной части растения была определена по интенсивности поглощения 1,1-дифенил-2-пикрилгидразильного радикала, возможности ингибирования перекисного микросомального окисления липидов и общего фенольного содержания.

Именно экстракт коры среди всех исследованных надземных органов растения показал высокую антиоксидантную способность со значением IC₅₀ 0,025 мг/мл и 0,014 мг/мл (ингибирование перекисного окисления липидов и очистка отДФПГ-радикала соответственно) [91].

Кроме того, теми же авторами было проведено дополнительное исследование спиртового экстракта коры на цитотоксическое действие в отношении клеток рака молочной железы и здоровых клеток с использованием МТТ-метода диагностики [91]. При этом было выявлено, что жизнеспособность клеток снизилась до 30% при добавлении экстракта в концентрации 0,5 мг/мл для обеих клеточных линий [91].

Схожие результаты были получены и группой других исследователей. Так, в ходе эксперимента «*in vitro*» с помощью МТТ-анализа была определена антипролиферативная эффективность экстрактов каштана конского [106]. Клеточные линии карциномы (Jurkat, СЕМ, HeLa и MCF-7) были обработаны экстрактами различных концентраций. Инкубация четырех линий раковых клеток с экстрактом концентрации 125 мкг/мл в течение 72 часов дала результаты в виде снижения выживаемости клеток на 93,7%, 32,3%, 20,4% и 40,4% соответственно. При этом в обработанных клетках линии HeLa было установлено значительное повышение содержания sub-G₀/G₁ в ДНК, являющегося маркером апоптоза [106].

Следует также отметить результаты исследования эсцина как натурального и безопасного средства терапии рака поджелудочной железы [113]. Полученные данные позволили предположить, что эсцин путем инактивации ядерного фактора NF-κB способен усиливать эффективность гемцитабина, что способствует борьбе с раковыми клетками [113]. Аналогичные результаты дали работы по оценке цитотоксичности эсцина в отношении H-Ras-трансформированной 5RP7 клеточной линии [99].

Интерес представляют также исследования, проведенные группой китайских ученых [115]. Было изучено действие эсцина, извлеченного из

семян каштана, в случае нарушения гематоретинального барьера и повышения его проницаемости. Выяснено, что сам эсцин в низких концентрациях не влияет на проницаемость барьера, однако он способен проявлять синергетический эффект при совместном введении с триамцинолона ацетонидом, что проявляется снижением проницаемости ГРБ после ишемии. Кроме того, только при введении вместе данные вещества вызывают значительное увеличение содержания окклюдина в слое ганглиозных клеток ишемизированной сетчатки. Таким образом, выявлено, что эсцин и триамцинолона ацетонид проявляют синергический защитный эффект на гематоретинальный барьер, связанный с активацией окклюдина, что имеет значение в лечении отека желтого пятна и сетчатки [115].

1.3. Лекарственные препараты на основе каштана конского обыкновенного

На российском и международном фармацевтическом рынке присутствует достаточно большое количество препаратов на основе каштана конского обыкновенного [12, 20, 23, 57, 58, 94]. Сырьем для производства данных средств служат семена каштана, реже – листья [20, 23, 53, 54]. Как правило, данные препараты обладают ангиопротекторным действием и предназначаются для лечения сосудистых патологий, в частности, варикозного расширения вен [12, 20, 23, 57].

Следует отметить, что на российском рынке доля российских же средств на основе каштана очень мала, что связано как с недостаточностью отечественной регламентной базы на сырье каштана, так и с низким темпом процессов импортозамещения в целом.

Характеристика некоторых наиболее известных и широко применяемых препаратов, полученных из сырья конского каштана обыкновенного, приведена ниже [20, 37, 56, 77].

- **Ангионорм[®]**, таблетки, покрытые оболочкой (рис. 3).



Рисунок 3 - Внешний вид упаковки препарата Ангионорм® [32].

Производитель: ЗАО «ФПК ФармВИЛАР», Россия.

Активные вещества: экстракт сухой, получаемый из смеси лекарственного растительного сырья — боярышника плоды (*Crataegi*), солодки корни (*Glycyrrhiza glabra* L.), каштана конского обыкновенного семена (*Aesculus hippocastanum* L.), шиповника плоды (*Rosae*).

Фармакологическая группа. Ангиопротекторы и корректоры микроциркуляции.

Фармакологические свойства. АнгиоНорм® обладает выраженной антиагрегационной, антитромбоцитарной активностью, ангиопротекторными и противовоспалительными свойствами, оказывает венотонизирующее и улучшающее микроциркуляцию действие, активизирует диуретическую функцию почек. АнгиоНорм® оказывает влияние на общее состояние организма: повышает физическую работоспособность, проявляет стресс-протективную активность и умеренный противоболевой эффект [3].

Показания к применению. В составе комплексной терапии заболеваний, сопровождающихся сосудистыми нарушениями, такими как повышение агрегации тромбоцитов (тромбозы, тромбоэмболии), нарушение проницаемости капилляров и микроциркуляции (тромбозы капилляров), нарушение венозного кровообращения (варикозное расширение вен,

посттромботический синдром, тромбозы) [3].

- **Анавенол®**, таблетки, покрытые оболочкой (рис. 4).



Рисунок 4 - Внешний вид упаковки препарата Анавенол® [2].

Производитель: ЗЕНТИВА к.с, Чешская Республика.

Активные вещества: Рутозид, эскулин, дигидроэргокристин.

Фармакологическая группа. Ангиопротекторы и корректоры микроциркуляции.

Фармакологические свойства. Комбинированный препарат. Оказывает вентонизирующее действие, уменьшает проницаемость сосудистой стенки, улучшает микроциркуляцию. Дигидроэргокристин является полусинтетическим производным алкалоидов спорыньи, обладает α -адреноблокирующим эффектом, расширяет артериолы, слегка повышает тонус вен и способствует улучшению периферического кровообращения. Рутозид и эскулин обладают вазопротекторным и антиэкссудативным действием [1].

Показания к применению. Хроническая венозная недостаточность (в том числе, посттромботический синдром), применяется в качестве средства комбинированной терапии при лечении трофической язвы голени, тромбозов, посттравматических расстройств микроциркуляции (после длительной иммобилизации нижних конечностей) [1].

- **Веноплант®**, таблетки пролонгированного действия, покрытые оболочкой (рис. 5).



Рисунок 5 - Внешний вид упаковки препарата Веноплант® [9].

Производитель: Доктор Вильмар Швабе ГмбХ & Ко. КГ, Германия.

Активные вещества: каштана конского семян экстракт сухой.

Фармакологическая группа. Ангиопротекторы и корректоры микроциркуляции.

Фармакологические свойства. Фитопрепарат, применяемый при нарушениях венозного кровообращения. Оказывает венотонизирующее, противоотечное, противовоспалительное и ангиопротекторное действие. Препятствует активации лизосомальных ферментов, расщепляющих протеогликан, повышает тонус вен, устраняет венозный застой, уменьшает проницаемость и ломкость капилляров. Уменьшает экссудацию, снижает выпот жидкости в ткани и ускоряет рассасывание существующего отека. Тормозит процессы воспаления, улучшает микроциркуляцию, способствует репарации органов и тканей [8].

Показания к применению. Хроническая венозная недостаточность I – III класса по классификации CEAP: варикозное расширение вен, отеки, судороги в икроножных мышцах, чувство тяжести в ногах [8].

- **Репарил®-гель Н**, гель для наружного применения (рис. 6).

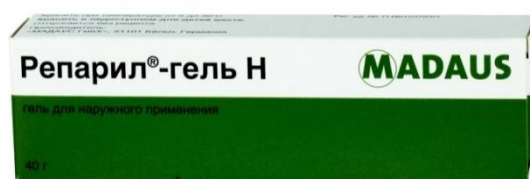


Рисунок 6 - Внешний вид упаковки препарата Репарил®-гель Н [71].

Производитель: Мадаус АГ, Германия.

Активные вещества: эсцин, диэтиламинсалицилат.

Фармакологическая группа. Ангиопротекторы и корректоры микроциркуляции.

Фармакологические свойства. Используется в восстановительном периоде после травм, операций, применяется для нормализации сосудистого тонуса и гемодинамики при флебитах, варикозном расширении вен, геморрое. Усиливает действие антикоагулянтов, назначать при беременности и кормлении грудью его не рекомендуется. Предназначен для нанесения на кожу при лечении поверхностных флебитов, варикозном расширении вен, ушибах, растяжениях, гематомах, тендовагинитах, пояснично-крестцовых радикулитах, люмбаго в качестве противовоспалительного и обезболивающего средства [70].

Показания к применению:

- болевой синдром при заболеваниях позвоночника (ущемление межпозвоночного диска, остеохондроз, люмбаго, ишиас);
 - артралгия при артрите;
 - артралгия и миалгия при ревматизме;
 - болевой синдром при травмах с повреждением связок, отеками, гематомами;
 - тендовагинит;
 - флебит, тромбфлебит;
 - варикозное расширение вен;
 - профилактика и лечение местных осложнений после в/в инъекций или инфузий (предупреждение развития гематом) [70].
- Эскузан[®], раствор для приема внутрь (рис. 7).



Рисунок 7 - Внешний вид упаковки препарата Эскузан® [67].

Производитель: Фарма Вернигероде ГмБХ, Германия.

Активные вещества: конского каштана семян экстракт сухой, тиамин гидрохлорид.

Фармакологическая группа. Ангиопротекторы и корректоры микроциркуляции.

Фармакологические свойства. Обладает антиоксидантным, противоотечным, антиэкссудативным, капилляропротекторным и вентонизирующим действием [87]. При регулярном приеме значительно снижает риск тромбообразования и атеросклероза сосудистой стенки. Антиоксидантный эффект проявляется благодаря содержащемуся в препарате тиамину, предотвращающему перекисное окисление липидов [87].

Показания к применению. Препарат применяют для терапии ХВН и ее проявлений в области нижних конечностей:

- отеки;
- судороги (особенно судороги икроножных мышц);
- боль, чувство тяжести в ногах, зуд, сопутствующий нарушениям венозного кровообращения;
- расширение вен, гематомы и сосудистые «звездочки»;
- флебиты, тромбозы;
- трофические изменения, язвы;
- восстановительный период после операций и травм, сопровождаемый

отеками и воспалением мягких тканей [87].

РектАктив®, суппозитории ректальные (рис. 8).



Рисунок 8 - Внешний вид упаковки препарата РектАктив® [69].

Производитель: ООО «Альтфарм», Россия.

Активные вещества: конского каштана плодов экстракт сухой.

Фармакологическая группа. Слабительное средство растительного происхождения.

Фармакологические свойства. Тритерпеновый сапонин эсцин, содержащийся в экстракте конского каштана, стимулирует интерорецепторы слизистой оболочки прямой кишки, вызывая усиление ее перистальтики и быструю эвакуацию каловых масс. Эффект наступает через 5-15 мин после применения суппозитория РектАктив®. Позывы к опорожнению кишечника прекращаются после акта дефекации [69].

Показания к применению. Функциональные запоры:

- привычные;
- старческие;
- запоры у малоподвижных больных;
- запоры, связанные с понижением чувствительности рецепторного аппарата прямой кишки и нарушением биоритма дефекации [69].

- **Конского каштана экстракт жидкий**, раствор для приема внутрь (рис. 9).



Рисунок 9 - Внешний вид упаковки препарата Конского каштана экстракт жидкий [60].

Производитель: ООО «Камелия НПП», Россия.

Активные вещества: конского каштана семян экстракт.

Фармакологическая группа. Ангиопротекторы и корректоры микроциркуляции.

Фармакологические свойства. Экстракт жидкий из семян конского каштана обыкновенного в качестве действующих веществ содержит тритерпеновые сапонины, основным компонентом является эсцин. Препарат обладает выраженным ангиопротекторным, противовоспалительным и обезболивающим действием. Фармакологическое действие препарата обусловлено уменьшением концентрации лизосомальных энзимов, в результате чего снижается распад мукополисахаридов в области стенок капилляров, снижается проницаемость сосудов. Кроме того, препарат обладает умеренными антиоксидантной, антигипоксической активностью и диуретическими свойствами [41].

Показания к применению. В качестве симптоматического средства в комплексном лечении варикозного расширения вен и хронической венозной недостаточности 3-4 класса по клинической Международной классификации хронических заболеваний вен нижних конечностей (CEAP), сопровождающихся болью, ощущением тяжести и чувством напряжения в нижних конечностях, ночными судорогами икроножных мышц, отеком ног

[41].

Отдельно в данной главе следует отметить препарат украинского производства **Эсфлазид®**, не представленный на российском фармацевтическом рынке [88, 114]. Препарат имеет сложный состав: эсцин из семян конского каштана, и флавазид - комплекс флавоноидов из листьях растения. Средство относится к группе ангиопротекторов, показано при лечении флебита, тромбофлебита, геморроя. По химическому составу и терапевтическому эффекту препарат близок к описанному выше Эскузану®. Форма выпуска - таблетки [88, 114].

1.4. Проблемы стандартизации сырья и препаратов каштана конского обыкновенного

В официальной медицине препараты на основе каштана конского обыкновенного имеют широкое применение [51]. При этом следует отметить отсутствие фармакопейных статей на сырье каштана конского. Учитывая данные факты, представляется необходимой разработка методов стандартизации сырья и препаратов на основе каштана конского обыкновенного.

В 2009 году на базе ВИЛАР проводились исследования, в ходе которых были выявлены морфолого-анатомические признаки цельных и измельченных семян каштана конского обыкновенного, предложены подходы к диагностике измельченных семян [24]. Однако в данной работе не использованы современные методы исследования, такие как люминесцентная микроскопия, которая позволяет определять локализацию БАС, что актуально для определения подлинности ЛРС. Также были разработаны методы анализа и стандартизации качества семян конского каштана и сухого очищенного экстракта на их основе [85]. Группой ученых на базе ООО «Камелия НПП» разработаны методики получения густого экстракта из семян каштана и оценки его качества [28].

Наблюдается интерес исследователей к листьям каштана конского. Так,

имеются работы, посвященные выявлению макро- и микроскопических диагностических признаков, но при этом нет данных по петиолярной анатомии листа каштана конского, которая является значимым методом в определении подлинности ЛРС. Разработаны методики получения сухого экстракта из листьев каштана конского и стандартизации экстракта и сырья [65, 64, 66]. Разработана методика количественного определения флавоноидов в листьях каштана конского [63].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. В результате анализа литературных данных выяснено, что каштан конский находит широкое применение как в народной, так и в официальной медицине разных стран. В настоящее время в России официальными являются лишь семена растения, за рубежом имеется опыт применения листьев, коры каштана; остальные органы – цветки, почки, экзокарпий либо не применяются, либо имеют ограниченное применение в народной медицине.
2. На российском фармацевтическом рынке наблюдается преобладание препаратов каштана конского импортного производства, что не удовлетворяет целям стратегии импортозамещения и обосновывает необходимость разработки новых отечественных фитопрепаратов.
3. С точки зрения химического состава наряду с семенами каштана конского перспективными для использования в качестве ЛРС могут являться листья, цветки, кора и почки растения. Показано наличие в семенах широкого комплекса сапонинов, основным из которых является эсцин, а также кумаринов и флавоноидов. В листьях и цветках каштана содержатся флавоноиды – производные кемпферола и кверцетина, витамины, дубильные вещества, пектины, слизи. Кора каштана также содержит сапонины, кумарины, дубильные вещества, фитостеролы и витамины.
4. Химический состав различных органов каштана обуславливает широкий спектр фармакологических эффектов. Важно отметить уникальное сочетание различных фармакологических эффектов в одном растении. Имеются публикации ряда ученых, посвященные изучению отдельных свойств каштана конского, таких, как ангиопротекторное, противовоспалительное, антиоксидантное, противоопухолевое.
5. В научно-практической медицине Российской Федерации находят применение и имеют соответствующую нормативную документацию только семена каштана конского. Отсутствует нормативная документация

на другие органы каштана конского (почки, цветки, кора), что препятствует использованию данных вида сырья в официальной медицинской практике.

6. Несмотря на хорошую степень изученности химического состава семян, листьев и цветков каштана, отсутствуют литературные данные по химическому составу и возможности применения в медицине почек каштана конского. С точки зрения внедрения новых видов лекарственного растительного сырья необходимо фармакогностическое изучение почек каштана – определение диагностически значимых анатомических признаков, фитохимические, фармакологические исследования.
7. Фармакогностическое исследование почек каштана с точки зрения применения в медицине и разработка нормативной документации для этого вида сырья создаст условия для более широкого использования доступной растительной массы каштана конского обыкновенного, что будет способствовать комплексному использованию природных ресурсов, а также позволит создать отечественные фитопрепараты, обладающие широким спектром фармакологической активности.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Растительные объекты исследования:

- Почки каштана конского (Ульяновская обл., апрель 2012 г.);
- Почки каштана конского (Пензенская обл., апрель 2016 г.);
- Почки каштана конского (Самарская обл., март 2018 г.);
- Почки каштана конского (Самарская обл., апрель 2019 г.);
- Плоды каштана конского (Ульяновская обл., октябрь 2017 г.);
- Кора каштана конского (Самарская обл., март 2018 г.);
- Цветки каштана конского (Самарская обл., июнь 2018 г.).

Изготовленные и изученные в ходе работы экстракты и лекарственные препараты:

- Извлечения из почек, листьев, цветков, семян, экзокарпия плодов каштана конского 1:50 на 40%, 70%, 96% этиловом спирте;
- Густой экстракт из почек каштана конского;
- Настойка почек каштана конского 1:5 на 40%, 70%, 96% этиловом спирте.

Индивидуальные вещества:

- ГСО лютеолина;
- СО рамноцитрина;
- СО 7,4'-диметилкемпферола.

Для определения антимикробной активности использовались следующие микроорганизмы:

- Клинические штаммы *Burkholderia cenocepacia* ST 208 (штаммы 105, 136) от пациентов с муковисцидозом;
- Клинические штаммы *Burkholderia multivorans* (штаммы 139, 141) от

пациентов с муковисцидозом;

- Клинический штамм *Pseudomonas aeruginosa* (штамм 799) от пациента с муковисцидозом;
- Лабораторные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*.

Эксперименты проводились с использованием следующего оборудования:

- Весы электронные САРТОГОСМ ЛВ 210-А;
- Весы Мора ВА-4М;
- Весы аптечные НТМИЗ ВСМ-1, ВСМ-5, ВСМ-20;
- Набор ареометров ИСП.АІ;
- Набор сит с отверстиями различного диаметра;
- Шкаф сушильный электрический круглый 2В-151;
- Термостат суховоздушный ТС-1/80;
- Цифровые микроскопы Motic DM-111 и Motic DM-39С-N9GO-А;
- Цифровой люминесцентный микроскоп Альтами ЛЮМ-2 с голубым (420-550 нм) и желтым (330-400 нм) светофильтрами (источник света - высоковольтная ртутная лампа НВО 100 Вт);
- Хроматографические пластинки Сорбфил-ПТСХ-АФ-А-УФ;
- Спектрофотометр Specord 40 (Analytik Jena);
- ЯМР-спектрометры Bruker AM-300 (300 МГц) и Bruker DRX 500 (126,76 МГц);
- Масс-спектрометр Kratos MS-30;
- Жидкостной микроколоночный хроматограф Милихром-6 (НПАО «Научприбор»); хроматографическая колонка стальная Элсико Kromasil C18 (5) (2 мм × 80 мм);
- Анализатор жидкости пламенно-фотометрический ПАЖ-1;
- Фотоколориметр КФК-3-01.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методики морфолого-анатомического анализа

Макроскопический анализ объектов проводили визуально согласно требованиям ОФС «Методы анализа лекарственного растительного сырья» ГФ РФ XIV издания [18]. Объекты рассматривали невооружённым глазом и с использованием лупы (кратность увеличения $\times 10$).

Для микроскопического исследования строения объектов использовали цифровые и люминесцентные микроскопы, изучение проводили на кратности увеличения 4×10 , 10×10 ; 40×10 , 100×10 .

Подготовка микропрепаратов осуществлялась по общей фармакопейной методике [18].

2.2.2. Химические методы анализа

Для предварительного определения групп БАС в ходе фитохимического анализа использовались цветные пробирочные реакции, характерные для определенных групп биологически активных соединений.

Цианидиновая реакция (проба Shinoda). Определялось наличие флавоноидов в извлечениях. К 1-2 мл извлечения добавляют 5 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и 5-10 мг цинка. Наблюдается красно-малиновое окрашивание [84, 82].

Проба Брианта. После проведения цианидиновой пробы к полученному раствору добавляют воду очищенную в соотношении 1:1 и прибавляют небольшой объем *n*-бутанола. В присутствии флавоноидных агликонов обнаруживается переход красно-малиновой окраски в органическую фазу. В случае присутствия гликозидов перехода окраски не происходит [84, 82].

Реакция с алюминия (III) хлоридом. К 1-2 мл извлечения прибавляют 2-3 мл 3% спиртового (на 96% спирте) раствора алюминия (III) хлорида. При наличии флавоноидов наблюдается появление желто-зеленой окраски [84, 82].

Реакция Сальковского. Предназначена для обнаружения тритерпеновых

сапонинов. Спиртовое извлечение либо сухой остаток смешивают с небольшим количеством хлороформа и прибавляют равный объем концентрированной серной кислоты. При наличии сапонинов верхний органический слой окрашивается в красный или фиолетово-красный цвет, нижний слой имеет желто-красную окраску [84].

Реакция Лафона. Используется для обнаружения сапонинов тритерпеновой природы. К 2 мл извлечения добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты, 1 мл этанола и 1 каплю 10% раствора сернокислого железа, нагревают. При наличии тритерпеновых сапонинов наблюдается сине-зеленая окраска [84].

2.2.3. Хроматографические методы анализа

Тонкослойная хроматография (ТСХ). Метод тонкослойной хроматографии [17] применялся при анализе водно-спиртовых извлечений из растительных объектов (различные органы каштана конского), хлороформного экстракта из почек каштана конского, а также при контроле хода колоночной хроматографии при наработке индивидуальных веществ.

ТСХ-анализ осуществлялся на пластинках «Сорбфил ПТСХ–АФ–А–УФ».

Образцы извлечений наносили точно с помощью микропипетки на стартовую линию, расположенную на расстоянии 1,5 см от края пластины, интервал между соседними точками составлял 1 см. После нанесения образцов пластину сушили на воздухе при комнатной температуре в течение нескольких минут, затем помещали в хроматографическую камеру, насыщенную парами растворителей. Хроматографировали в следующих системах растворителей:

- хлороформ:этанол 19:1;
- *n*-бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:2).

По достижении фронтом растворителей высоты около 8 см пластинка вынималась и сушилась на воздухе при комнатной температуре до полного удаления запаха растворителей. Обнаружение пятен веществ осуществлялось

просмотром в УФ-свете при $\lambda=254$ нм и $\lambda=366$ нм. Для оценки химической природы обнаруживаемых на хроматограмме веществ, пластинка обрабатывалась соответствующим реактивом: щелочным раствором диазобензолсульфо кислоты (ДСК) (на фенольные соединения), 20% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты (на тритерпеновые сапонины), 3% спиртовым раствором алюминия хлорида (III) (на флавоноиды).

Адсорбционная колоночная хроматография. Для изучения химического состава почек каштана конского и для выделения индивидуальных компонентов использовался метод адсорбционной колоночной хроматографии [17].

Измельченные воздушно-сухие почки каштана конского обыкновенного (100,0 г), экстрагировали хлороформом в аппарате Сокслета в соотношении «сырье:экстрагент» 1:3 до полного истощения сырья. Хлороформное извлечение упаривали под вакуумом до густого остатка (объемом около 100 мл). Упаренный экстракт смешивали с 50 г силикагеля L 100/160) и высушивали. Полученный порошок (смесь экстракта и силикагеля) в виде взвеси в хлороформе вносили на силикагель в хроматографическую колонку (8 x 10 см). Элюирование проводили хлороформом и смесью хлороформ:этиловый спирт в различных соотношениях (99:1; 98:2; 97:3; 95:5; 93:7; 90:10; 85:15; 80:20; 70:30, 60:40).

Методом ТСХ осуществлялся контроль за разделением компонентов.

В результате получены фракции, содержащие некоторые БАС почек каштана конского. Дальнейшее разделение и очистка фракций проводилась на микроколонках с использованием полиамида для колоночной хроматографии (Woelm Pharma, Германия), силикагеля КСКГ измельченного, Сефадекса LH-20 (Швеция), а также методом перекристаллизации смесью хлороформа и этанола.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. ВЭЖХ-анализ [17]

осуществляли на микроколоночном жидкостном хроматографе «Миличром-6» (НПАО «Научприбор») с ультрафиолетовым детектором в следующих условиях: изократический режим, стальная колонка «Элсико» (№28042; 2 мм х 80 мм; Kromasil C18; 5 мкм), подвижная фаза - различные соотношения ацетонитрила и воды с подкислением уксусной кислотой, скорость движения растворителя - 100 мкл/мин, объем растворителя - 2500 мкл, объем пробы 2-6 мкл. Аналитическая длина волны – 360 нм.

2.2.4. Физико-химические методы анализа

Спектрофотометрия. Для определения суммы флавоноидов в объектах и для исследования и идентификации отдельных соединений использовала метод УФ-спектрофотометрии [17]. Определение проводили на приборе Specord 40 (Analitik Jena) в кюветах с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 до 500 нм. Раствором сравнения служил 96% этиловый спирт. Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения WinASPECT (Analitik Jena AG), Microsoft Excel (Microsoft Corporation).

ЯМР-спектроскопия и масс спектральный анализ. Физико-химические и спектральные характеристики выделенных веществ [17] определяли путем регистрации ¹H-ЯМР спектров на приборе «Bruker AM 300» (300 МГц), ¹³C-ЯМР спектров на приборе «Bruker DRX 500» (126,76 МГц); регистрацию масс-спектров электронного удара проводили на приборе «Kratos MS-30» при энергии ионизирующих электронов 70эВ и колебании температурного режима ионного источника от 100 до 250 °С. Определение температуры плавления проводили на блоке Кофлера.

2.2.5. Технологические методы

Получение водно-спиртовых извлечений. В аналитических целях были получены водно-спиртовые извлечения из различных органов каштана конского на различных экстрагентах (40%, 70%, 96% спирт) по следующей методике:

Около 1,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц 2 мм, переносили в термостойкую колбу на 100 мл и прибавляли 50 мл экстрагента, затем колбу взвешивали. Производили нагрев колбы с присоединенным обратным холодильником в течение 60 минут на кипящей бане. После остывания колбы и извлечения доводили массу колбы до первоначального значения с помощью добавления экстрагента. Полученное извлечение фильтровали во флаконы темного стекла.

Получение густого экстракта из почек каштана конского обыкновенного. Для получения густого экстракта из почек каштана конского нами использовался метод циркуляционной экстракции в аппарате Сокслета с рабочим объемом камеры 200 мл. Сырье, измельченное до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в подготовленный марлевый патрон, общая масса составила 100 г. Патрон помещали в экстрактор, добавляли хлороформ (экстрагент) в количестве 200 мл и экстрагировали в течение 6-8 часов до полного обесцвечивания хлороформа в экстракторе. После истощения шрота экстракт сгущали на роторно-вакуумном испарителе до 1/10 от первоначального объема.

Получение настойки почек каштана конского обыкновенного. Приготовление настойки почек каштана конского осуществлялось методом дробной мацерации [10, 43], который был модифицирован на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ. и апробирован на различных видах сырья, содержащего фенилпропаноиды и флавоноиды (Патент РФ на изобретении № 2102999, № 2134584, № 2133620 и др.).

Настойку получали с использованием 70% этилового спирта в соотношении 1:5.

Стадии получения настойки почек каштана конского:

День 1. 150,0 г почек, измельченных до размера частиц с диаметром

около 2 мм, помещали в три экстрактора, распределив на навески по 50,0 г.

В первый экстрактор добавляют полуторный объем (75 мл) 70% этилового спирта и оставляют на 2 часа для намачивания. После добавляют пятикратный объем (250 мл) экстрагента и оставляют на 24 часа при комнатной температуре.

Во второй экстрактор добавляют полуторный объем (75 мл) 70% этилового спирта и оставляют для намачивания на сутки при комнатной температуре.

День 2. 250 мл извлечения переливают из первого экстрактора во второй и оставляют последний на 24 часа при комнатной температуре.

В первый экстрактор добавляют 250 мл свежего экстрагента и оставляют на сутки при комнатной температуре.

В третий экстрактор добавляют полуторный (75 мл) объем 70% этилового спирта и оставляют для намачивания на сутки.

День 3. 250 мл извлечения из второго экстрактора переливают в третий и оставляют при комнатной температуре на 24 часа.

Из первого экстрактора переливают 250 мл извлечения во второй экстрактор и оставляют последний на сутки при комнатной температуре.

В первый экстрактор добавляют 250 мл свежего экстрагента и оставляют на сутки.

День 4. Из третьего экстрактора сливают полученный экстракт в сосуд для готовой продукции (1/3 от общего объема).

Из второго экстрактора переливают 250 мл извлечения в третий и оставляют при комнатной температуре на 24 часа.

Первый экстрактор нагревают на водяной бане с обратным холодильником при температуре 60 °С в течение 30 мин. Полученное извлечение переливают во второй экстрактор и оставляют на сутки при комнатной температуре. Сырье из первого экстрактора считается отработанным.

День 5. Из третьего экстрактора сливают полученный экстракт в сосуд для готовой продукции (всего 2/3 от целевого объема).

Второй экстрактор нагревают на водяной бане с обратным холодильником при температуре 60 °С в течение 30 мин. Полученное извлечение переливают в третий экстрактор и оставляют на сутки при комнатной температуре. Сырье из второго экстрактора считается отработанным.

День 6. Третий экстрактор нагревают на водяной бане с обратным холодильником при температуре 60 °С в течение 30 мин. Полученное извлечение сливают в сосуд для готовой продукции (общий объем составляет 750 мл). Сырье из второго экстрактора считается отработанным.

Полученную настойку выдерживают при температуре 8 °С в течение 2-3 суток и фильтруют. Готовый продукт фасуют во флаконы темного стекла.

2.2.6. Микробиологические методы анализа

В соответствии с МУ 4.2.1890-04 проводилось определение минимальной ингибирующей концентрации исследуемых объектов (метод двойных серийных разведений в бульоне) [59]. После инкубации микроорганизмов в термостате при температуре в течение 48-72 часа производился учет результатов анализа. При этом визуально оценивалась задержка роста штаммов. Из лунок с видимой задержкой роста осуществлялся высев на питательные среды (5% кровяной агар-агар), через 24 часа отсутствие роста оценивалось как бактерицидный эффект (далее в таблицах: *роста нет*), а появление видимого роста, но с его задержкой – как бактериостатический (далее в таблицах: *задержка роста*).

2.2.7. Фармакологические методы анализа

В ходе диссертационной работы было проведено исследование диуретической активности и острой токсичности настойки почек каштана конского на 70% этаноле.

Эксперимент проводился на 20 беспородных белых крысах, разделенных на две группы - эксперимент и контроль. Масса животных составляла от 200 до 220 г. В эксперименте использовали только половозрелых самцов крыс. Животные находились в виварии на стандартной диете. Доступ животных к воде был неограниченным.

Диуретическая активность настойки почек каштана конского обыкновенного на 70% этиловом спирте в дозе 100 мкл / кг определялась в хроническом эксперименте [46].

За сутки до эксперимента всем крысам принудительно давали водную нагрузку в объеме 3% от массы тела животного. В день проведения эксперимента контрольная группа внутрижелудочно получала водно-спиртовую нагрузку, экспериментальная группа получала исследуемый препарат в аналогичном объеме. Обе группы животных помещали на сутки в обменные клетки. Осуществляли сбор 4-х- и 24-х-часовых порций мочи. Проводилось определение почечной экскреции воды, концентрации микроэлементов (натрия и калия) методом пламенной фотометрии на пламенном анализаторе жидкости. Определение креатинина проводилось колориметрическим методом. Статистическая обработка полученных данных проводилась по критерию Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Statistica 8.0 и Microsoft Excel 2010 «Пакет анализа».

Исследование острой токсичности настойки почек каштана на 70% этаноле проводилось в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 [14]. Изучались две группы крыс. Первая группа получала внутрижелудочно однократно настойку почек каштана в дозе 0,5 г/кг на фоне 3% водной нагрузки, вторая, контрольная группа – 70% спирт в аналогичном объеме. В первый день эксперимента за животными велось непрерывное наблюдение, общая продолжительность исследования составила 14 дней. В общей сложности было проведено 6 серий опытов.

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОРГАНОВ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО

В настоящее время наиболее широкое применение в качестве лекарственного растительного сырья находят семена каштана конского [15, 19, 47]. Семена являются ценным лекарственным сырьем для получения ряда препаратов с ангиопротекторной, капилляроукрепляющей активностью [47]. Стандартизацию ЛРС каштана конского в России на сегодняшний момент регламентирует ТУ 9377-075-04868244-2008 [79, 47]. Несмотря на высокую ценность и востребованность каштана, в ГФ РФ XIV издания фармакопейная статья на его семена отсутствует. Необходимо отметить, что как в РФ, так и за рубежом, вопрос стандартизации семян каштана в значительной степени изучен, в том числе в аспекте морфолого-анатомического анализа [25]. Однако, до сих пор известны случаи сбора вместо семян каштана конского семян другого вида каштана, каштана благородного (*Castanea saliva*) [47]. В целях повышения уровня стандартизации необходима разработка современной фармакопейной статьи на ЛРС каштана конского.

Кроме того, рядом авторов ведется изучение листьев каштана конского. Одной из проблем стандартизации является подтверждение подлинности лекарственного растительного сырья, в частности, в разделе «Микроскопические признаки» должны быть приведены петиолярные признаки листьев, в настоящее время не изученные, что обуславливает необходимость проведения морфолого-анатомического исследования черешков листьев каштана конского обыкновенного.

Помимо этого, перспективным для изучения сырьем являются почки каштана. Предварительный литературный анализ позволил выявить очень незначительный объем информации по морфологии почек каштана [39, 83, 26], в связи с чем актуально изучение характерных диагностических признаков почек каштана и разработка методик стандартизации данного вида сырья.

3.1. Морфолого-анатомическое исследование семян каштана конского обыкновенного методом люминесцентной микроскопии

Одним из современных селективных методов диагностики растительного сырья является анализ люминесценции его тканей [50]. Анализ научной литературы не выявил данных по люминесценции семян каштана конского и его потенциальных примесей.

Морфология семян каштана конского в достаточной степени изучена [22, 24, 25, 47, 55, 83]. Семена неправильной округлой, слегка сдавленной формы, бугристые с поверхности. Покрываются гладкой блестящей кожурой ярко-коричневого цвета, иногда с более светлыми узорами напоминающими спил дерева (рис. 10 А). В основании семени имеется крупное шероховатое пятно неоднородного серого цвета, являющееся местом прикрепления. Форма пятна неравномерно-округлая, напоминает форму копыта (рис. 10 Б).



Рисунок 10 - Семена каштана конского: А – глянцевая поверхность семени; Б – пятно места прикрепления в основании семени.

На поперечном сечении семени по периферии срезов хорошо заметна семенная кожура, как правило, темного коричневого либо желто-коричневого цвета.

При рассмотрении семенной кожуры на малой кратности увеличения (x100) хорошо заметны: верхний эпидермис, визуально определяемый по ярко-

оранжевой окраске клеточных стенок; паренхима семенной кожуры, более плотная с поверхности и рыхлая ближе к зародышу (рис. 11 А). Внутренняя часть семенной кожуры содержит крупные коллатеральные пучки овальной формы, расположенные неравномерно в один ряд (рис. 11 Б).

При облучении препарата УФ-светом с $\lambda=360$ нм заметна темно-красная люминесценция клеточных стенок паренхимы семенной кожуры и светлоголубое свечение их протопластов (рис. 11 В). При облучении светом видимой области спектра с $\lambda=420$ нм темно-красная люминесценция клеточных стенок сохраняется. Протопласты в измененных условиях облучения ($\lambda=420$ нм) светятся слабым желтым цветом (рис. 11 Г).

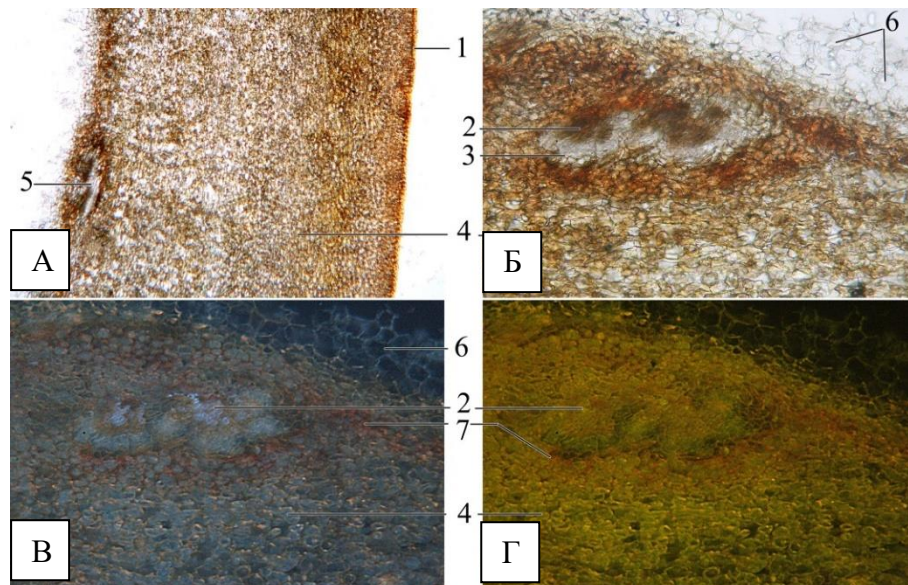


Рисунок 11 - Семенная кожура каштана конского: А – фрагмент семенной кожуры (x40), Б – фрагмент семенной кожуры с проводящим пучком (x100); В – люминесценция пучка при $\lambda=360$ нм (x100); Г - люминесценция пучка при $\lambda=420$ нм (x100).

Обозначения: 1 – эпидермис семенной кожуры; 2- ксилема пучка; 3 – флоэма пучка; 4 – плотная паренхима семенной кожуры; 5 – проводящий пучок; 6 – люминесценция тканей зародыша; 7 – люминесценция паренхимы семенной кожуры.

При детальном рассмотрении тканей на большом увеличении (x400) видна структура коллатерального пучка. Сосуды ксилемы пигментированы тёмно-коричневым или оранжево-коричневым пигментом (рис. 12 А), люминесцирующим ярко-голубым свечением при ($\lambda=360$ нм), что говорит о их лигнификации и фенольной природе пигмента (рис. 12 Г, Д).

Клетки флоэмы тонкостенные, ближе к ксилеме они мелкие, угловатые, хорошо заметные по темно-бурой люминесценции оболочек (при $\lambda=360$ нм). Основная часть флоэмной ткани крупноклеточная, широкопросветная. Клеточные стенки ткани светятся желтым цветом при облучении светом с $\lambda=420$ нм и светло-голубым при облучении УФ-светом с $\lambda=360$ нм (рис. 12 В, Г).

На поперечных срезах семян клетки эпидермы имеют полисадноподобную форму. Их оболочки тонкие, оранжево-коричневые, что согласуется с литературными данными [24, 25]. Оболочки клеток эпидермы слабо люминесцируют при облучении УФ-светом ($\lambda=360$ нм), однако достаточно ярко светятся при облучении светом с $\lambda=420$ нм. В эпидермальных клетках семени диагностируются аморфные протопласты, имеющие характерное для фенольных соединений кумариновой природы голубое свечение (рис. 13 Б).

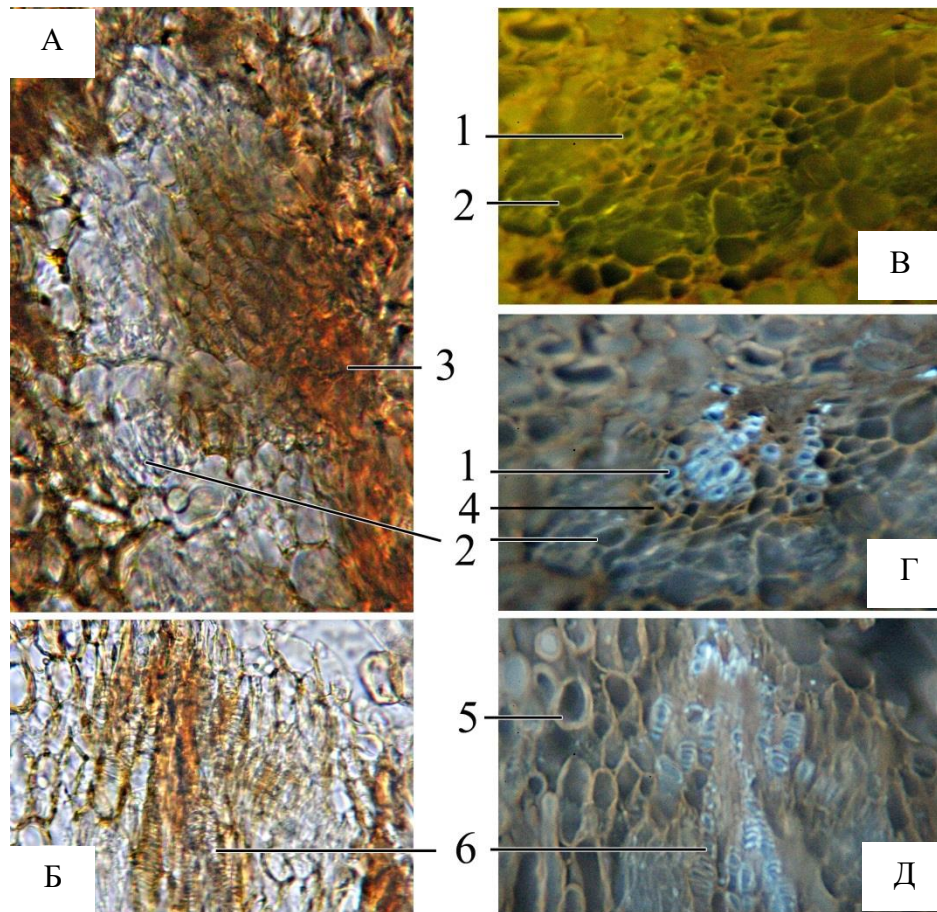


Рисунок 12 - Проводящие пучки семенной кожуры (x400): А – фрагмент семенной кожуры с пучком; Б – сосуды ксилемы; В – люминесценция пучка при $\lambda=420$ нм; Г – люминесценция пучка при $\lambda=360$ нм; Д – люминесценция сосудов пучка при $\lambda=360$ нм.

Обозначения: 1 - сосуды ксилемы; 2 - флоэма пучка; 3 - пигментированные клетки паренхимы; 4 - пигментированные клетки флоэмы; 5 - клетки паренхимы семенной кожуры; 6 - спиральные сосуды.

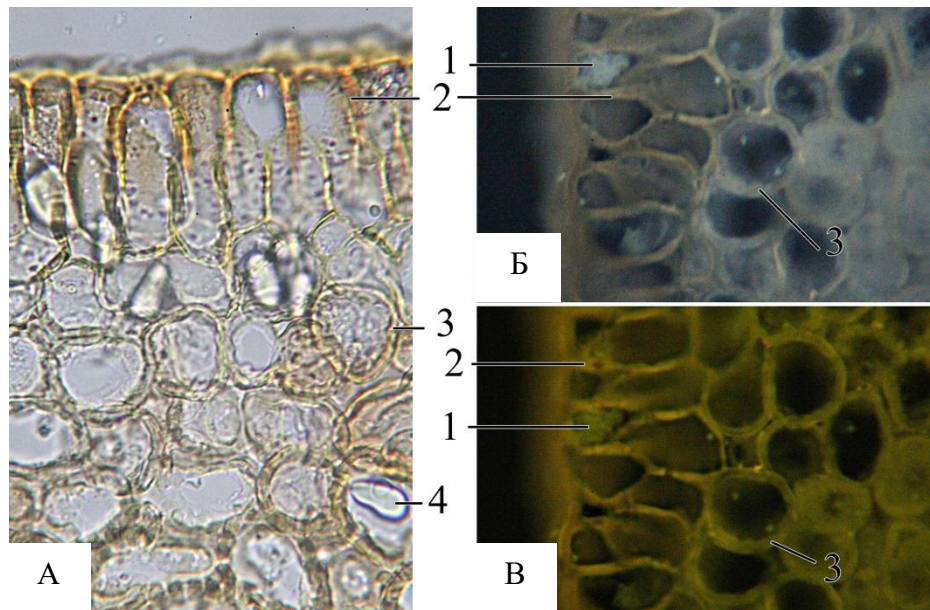


Рисунок 13 - Эпидермис семенной кожуры каштана конского (x 400): А – эпидерма в проходящем свете; Б – люминесценция эпидермы при $\lambda=360$ нм;

В - люминесценция эпидермы при $\lambda= 420$ нм.

Обозначения: 1 - протопласт клеток; 2 - клеточная стенка; 3 – паренхима; 4 - крахмальное зерно.

При рассмотрении эпидермы с поверхности семени видны эпидермальные клетки, угловатые по форме, с заметно утолщенными светло-коричневыми клеточными стенками (рис. 14 А). В полостях клеток диагностируется, как правило, неокрашенный протопласт. При облучении клеток светом с $\lambda=360$ нм наблюдается оранжево-желтая люминесценция протопласта. Клеточные стенки при этом почти не светятся (рис. 14 В). Люминесценция протопластов усиливается при облучении светом с $\lambda=420$ нм, при этом цвет люминесценции не изменяется (рис. 14 Б).

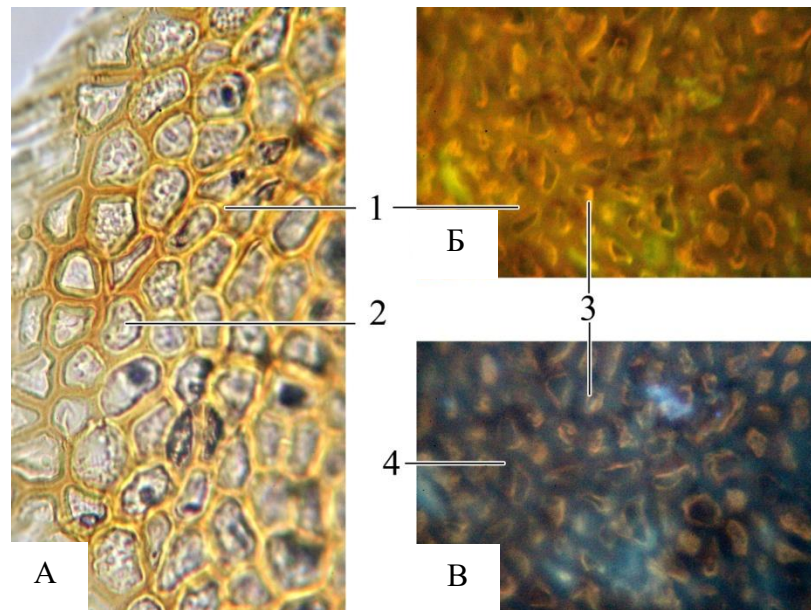


Рисунок 14 - Эпидермис семенной кожуры каштана конского с поверхности (x 400): А – фрагмент в видимом свете; Б - люминесценция при $\lambda=420$ нм; В - люминесценция при $\lambda=360$ нм.

Обозначения: 1, 4 – клеточная стенка; 3 – свечение протопласта; 2 – неокрашенный протопласт.

Основная ткань семенной кожуры составлена из округлых либо овальных паренхимных клеток. Форма и размеры их варьируют незначительно. Ближе к зародышу паренхима более рыхлая с заметными крупными межклетниками. Нативно клеточные стенки слабо окрашены в светло-коричневый цвет. В полостях клеток видны элементы аморфного протопласта, как правило, не пигментированного и имеющего светло-серую окраску (рис. 15 А).

При рассмотрении паренхимы семенной кожуры в УФ-свете ($\lambda=360$ нм) отмечается яркая светло-голубая люминесценция протопластов, что связано, вероятно, с кумариновой природой веществ, входящих в его состав (рис. 15 Б). При облучении клеток паренхимы светом с $\lambda=420$ нм протопласты вместе с оболочками клеток люминесцируют одинаково ярко-желтым цветом, характерным для большинства веществ фенольной природы, в частности, флавоноидов и кумаринов (рис. 15 В).

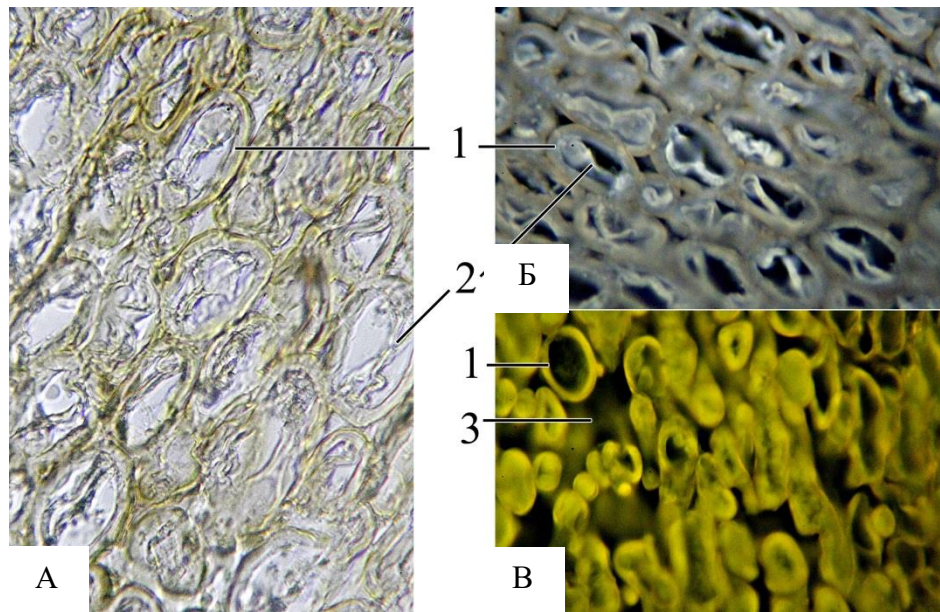


Рисунок 15 - Паренхима семенной кожуры каштана конского (x 400): А - фрагмент паренхимы семенной кожуры в дневном свете; Б - люминесценция при $\lambda=360$ нм; В - люминесценция при $\lambda=420$ нм. Обозначения: 1 - клеточная стенка; 2 – протопласты; 3 – межклетники.

Остатки эндосперма, диагностируемые и описанные ранее в литературе [25] как самый внутренний слой семенной кожуры, видны в виде тонкой пленки из деформированных клеток. Данная ткань не имеет люминесценции в используемых диапазонах возбуждения.

Запасающая паренхима семядолей мелкоклеточная, однородная. Клетки её тонкостенные, их оболочки целлюлозные, непигментированные. В протопласте клеток хорошо заметны крупные крахмальные зерна неправильной грушевидной, иногда округлой или овальной формы. Крахмальные зерна могут быть простыми и сложными. В клетках также диагностируется неструктурированный алейрон. В паренхиме семядолей встречаются мелкие одиночные проводящие пучки (рис. 16 А).

Люминесценция паренхимы семядолей незначительна и связана с фенольной природой протопласта. При облучении светом с $\lambda=360$ нм протопласты слабо светятся светло-голубым цветом, при $\lambda=420$ нм – желтым (рис. 16 В, Г). Крахмальные зерна дают незначительное свечение при

облучении светом с $\lambda=420$ нм (рис. 16 Д, Е).

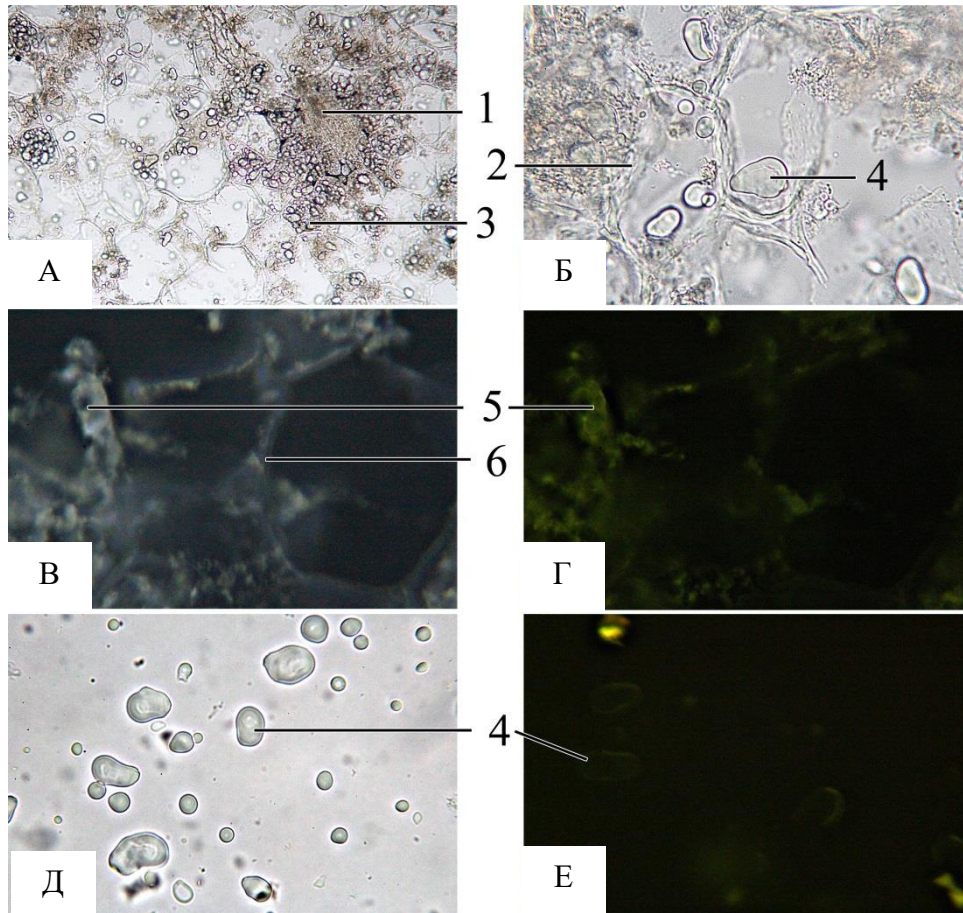


Рисунок 16 - Паренхима семядолей плодов каштана конского: А – фрагмент семядоли с проводящим пучком (x 100); Б – клетки паренхимы с алейроном и крахмальными зернами (x 400); В – люминесценция протопласта при $\lambda=360$ нм (x 400); Г – люминесценция протопласта при $\lambda=420$ нм (x 400), Д – простые и сложные крахмальные зерна (x 400); Е - люминесценция протопласта при $\lambda=420$ нм (x 400).

Обозначения: 1 – проводящий пучок; 2 – клеточная стенка; 3 – протопласт клеток; 4 – грушевидное крахмальное зерно; 5 – свечение протопласта; 6 – свечение клеточной стенки.

3.2. Изучение петиолярной анатомии листьев каштана конского обыкновенного

Ввиду того, что наиболее селективными в ботанике считаются анатомические особенности черешков и рахисов листьев, на начальном этапе эксперимента нами исследовались только поперечные срезы осевых частей сложного листа – рахисов [75, 47, 45, 13, 50].

Известно, что рахисы листьев неоднородны по длине. Поэтому анализу подвергали срезы в трёх основных местах: базальной части рахиса (место прикрепления листа), медиальной части (наиболее протяженная средняя часть) и апикальной (непосредственно приближенной к листовым пластинкам) [52, 74, 75].

Первичным диагностическим признаком в петиолярной анатомии считаются особенности очертаний поперечных сечений. Очертания поперечных сечений рахисов листьев каштана приведены на рис. 17.

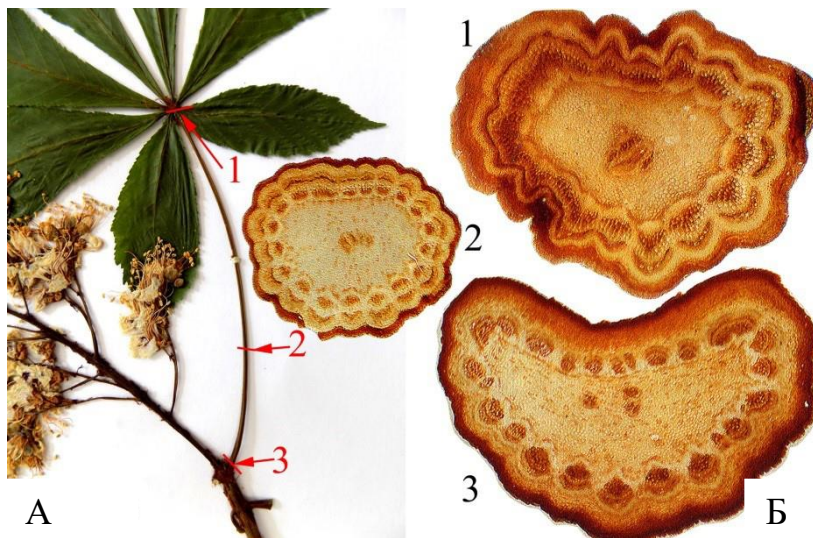


Рисунок 17 - Топография поперечных сечений рахиса листа каштана конского: А – фрагмент гербарного листа с рахисом; Б – поперечные сечения рахиса: 1 – апикальная часть (ближе к листовым пластинкам); 2 – медиальная часть (середина рахиса); 3 – базальная часть (основание).

Из рисунка видно, что поперечные сечения в различных местах среза отличаются по размеру и форме. Так, базальная часть имеет С-образное

очертание с округло-выгнутой абаксиальной (нижней) стороной и вогнутой адаксиальной (верхней) стороной черешка. Поверхность базальной части однородно-волнистая (рис. 17 Б-3). Медиальный срез почти овальной формы с равномерно волнистой поверхностью. Верхняя (адаксиальная) сторона медиального среза ровная (рис. 17 Б-2). Апикальный срез имеет неправильную угловатую форму с неоднородной волнистостью поверхности.

Размеры поперечных сечений различны. Медиальный срез по диаметру уступает базальному и апикальному и достигает 2-3 мм. Базальный срез наиболее крупный, в самой широкой части достигает 4-5 мм.

Поверхность рахиса черешка покрыта мелкоклеточной эпидермой со слабо заметной при дневном свете кутикулой. При большом увеличении (x400) заметны отличия поверхности рахиса с разных его сторон (рис. 18).

Как уже отмечалось выше, в очертаниях срезы рахисов равномерно волнистые. Однако при детальном рассмотрении (x400) видно, что эпидермальная часть в адаксиальной и боковой части рахиса имеет дополнительно мелкую волнообразную структуру – «рябь». С абаксиальной стороны эпидермис более-менее ровный и мелкой ряби не имеет.

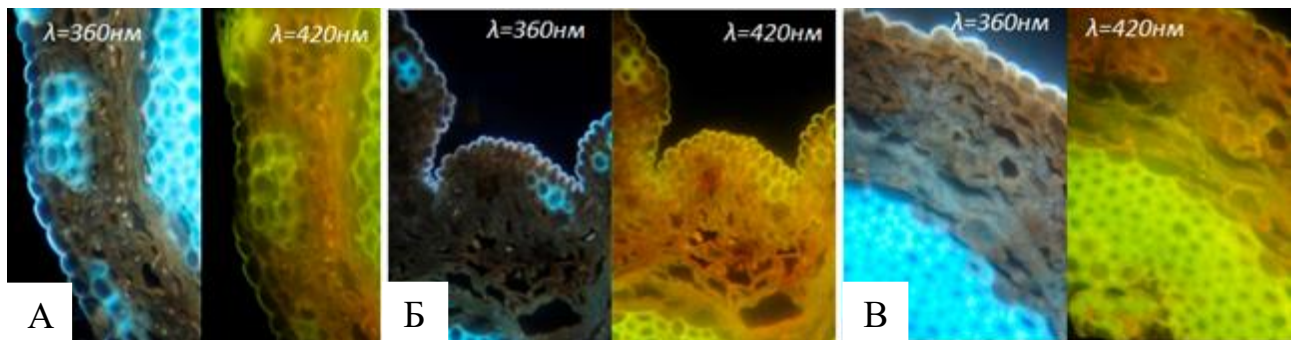


Рисунок 18 - Люминесценция поверхности срезов черешка листа каштана конского (X400): А – адаксиальная сторона; Б – борт черешка; В - абаксиальная сторона.

При рассмотрении срезов под люминесцентным микроскопом были выявлены некоторые гистологические особенности их поверхности. По всей длине рахиса эпидермис покрыт тонкой кутикулой, люминесцирующей

светло-голубым цветом при облучении ее УФ-светом с $\lambda=360$ нм и желтым – при $\lambda=420$ нм. Протопласты клеток эпидермы при данных условиях облучения не люминесцируют (рис. 18 А).

Непосредственно под эпидермой при люминесцентной микроскопии выявлена гиподерма, слабозаметная в дневном свете. Гиподерма представлена небольшими группами клеток со склерифицированными оболочками, светящимися голубым цветом при облучении ее УФ-светом с $\lambda=360$ нм и желтым – при $\lambda=420$ нм за счет полифенола – лигнина (рис. 18 А, Б). Необходимо отметить, что гиподерма наиболее выражена с адаксиальной стороны рахиса, где может достигать в толщину до двух рядов клеток (рис. 18 А). С бортов рахиса гиподерма представлена слабее и имеет в толщину только один ряд клеток (рис. 18 Б). С абаксиальной стороны гиподерма не выражена (рис. 18 В).

Гистологический анализ срезов не выявил под эпидермой выраженной колленхимы. При этом основная паренхима коровой части рахиса представлена крупными клетками, угловатыми, иногда смятыми, со значительно утолщенной клеточной стенкой, подобно уголковой колленхиме (рис. 18 А). Стенки основной паренхимы неоднородно люминесцируют. Так, при облучении ее УФ-светом с $\lambda=360$ нм наблюдается голубое свечение внутренней поверхности клеточных стенок и светло-бурое – их внутренней части. При облучении паренхимы светом с $\lambda=420$ нм клеточная стенка люминесцирует желтым цветом.

Проводящая система рахиса пучкового типа. При этом выражены две группы пучков. Первая основная группа крупных коллатеральных пучков расположена строго по кругу по периферии поперечного среза. Число пучков варьирует по длине рахиса, наибольшее их количество в базальной части – около 30. В медиальной части рахиса пучков меньше, чем в базальной, и насчитывается около 18-20. В апикальной части их наименьшее число – около 15 (рис. 17 Б).

Ткани проводящих пучков проявляют свойства люминесценции. В ксилемной области пучков люминесцируют ярко-голубым цветом лигнифицированные клеточные стенки сосудов при облучении УФ-светом с $\lambda=360$ нм. При облучении светом с $\lambda=420$ нм лигнифицированные стенки светятся лимонно-желтым цветом. Клетки сердцевинных лучей ксилемы светятся бурым цветом при $\lambda=360$ нм, что характерно для ряда фенольных соединений флавоноидной природы (рис. 19 А). Флоэмная часть пучка люминесцирует за счет клеточных стенок и аморфного протопласта исходного оранжево-коричневого цвета (рис. 19 Б).

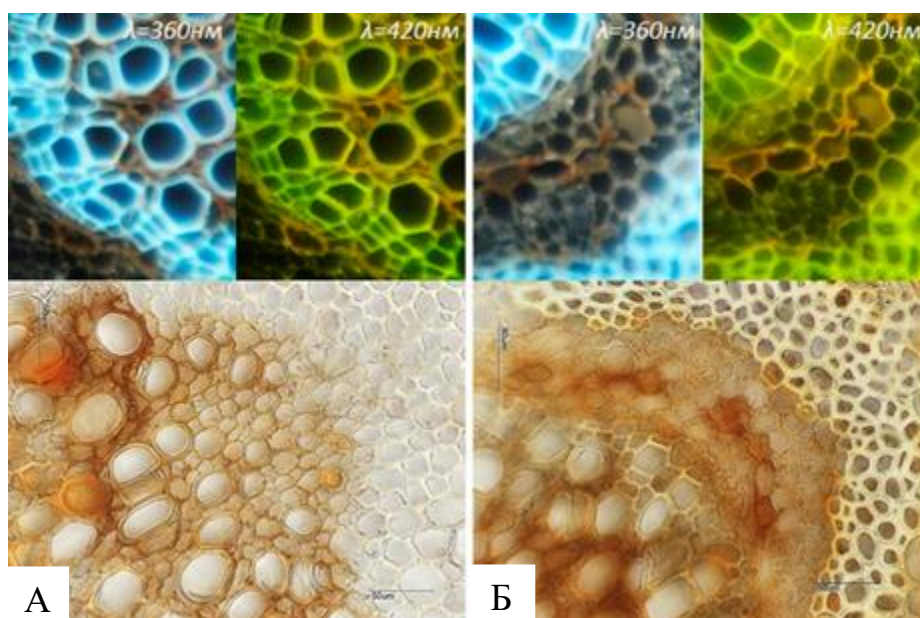


Рисунок 19 - Люминесценция периферических проводящих пучков черешка листа каштана конского (x400): А – ксилемная часть пучка; Б – флоэмная часть пучка.

Проводящие пучки со стороны флоэмной части армированы группой склеренхимных лубяных волокон с заметно утолщенными клеточными стенками. В широкопросветных полостях волокон заметен протопласт бурого цвета (рис. 20 А). В ксилемной части пучка также локализована группа склеренхимных волокон либриформа, клеточные стенки которых утолщены слабее, чем у лубяных волокон (рис. 20 Б).

Склеренхима флоэмы и ксилемы светится за счет лигнифицированных клеточных стенок голубым ($\lambda=360$ нм) и желтым ($\lambda=420$ нм) цветом (рис. 20).

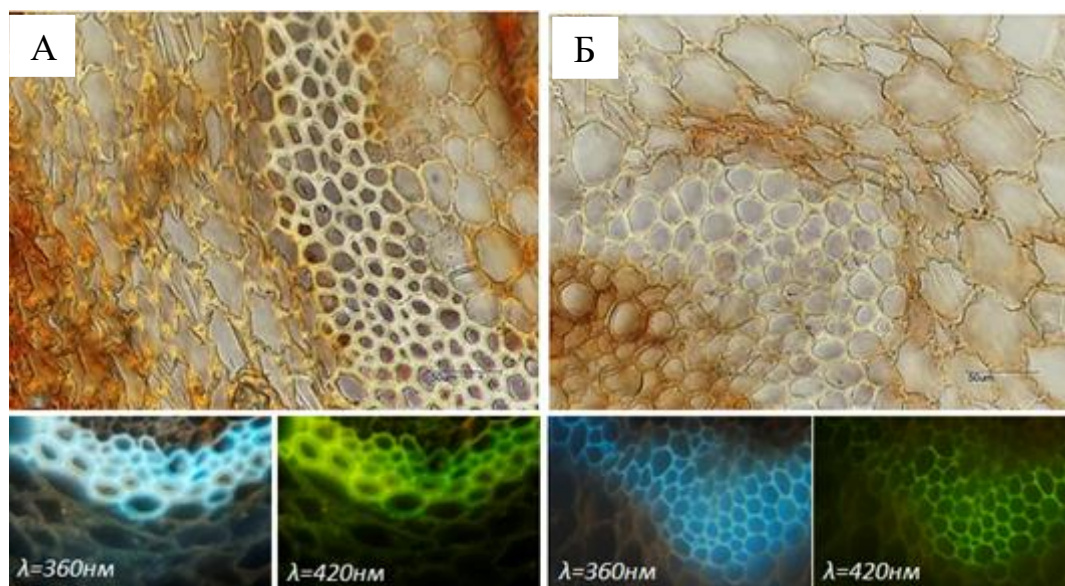


Рисунок 20 - Люминесценция склеренхимы пучков черешка листа каштана конского (x400): А – флоэмная склеренхима; Б – ксилемная часть пучка.

Вторая группа пучков локализована в центре рахиса в паренхиме сердцевины. На базальном срезе при основании рахиса диагностируются три коллатеральных пучка округлой формы, расположенных в непосредственной близости друг к другу (рис. 17 Б-3). Далее по длине рахиса пучки незначительно увеличиваются в размерах и сливаются в один структурный элемент, схожий с концентрическим амфивазальным пучком (рис. 21 А, Б).

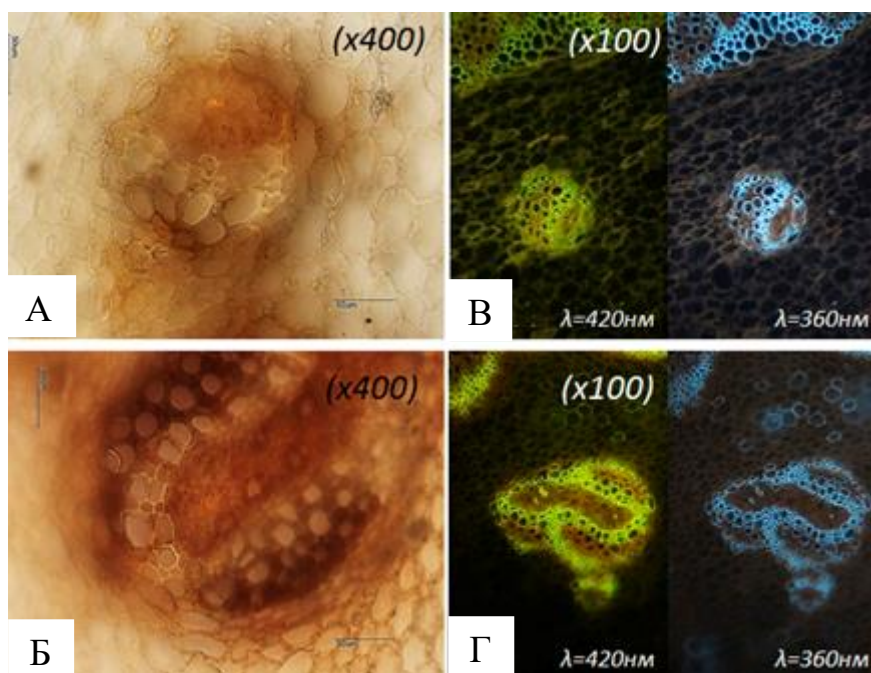


Рисунок 21 - Люминесценция центральных проводящих пучков черешка листа каштана конского: А, Б – (x400); В, Г – (x100).

Люминесценция тканей центральной группы пучков аналогична люминесценции периферических пучков (рис. 21 В, Г).

Центральную часть рахиса по всей его длине заполняет основная паренхима сердцевины. Клетки сердцевины на поперечном сечении крупнопросветные, тонкостенные. Клеточные стенки волнисто-извилистые, целлюлозные, слабо желтого цвета. В основной массе однородных клеток сердцевины часто встречаются более мелкие, иногда смятые клетки с пигментированными клеточными стенками. Они не реагируют на сернокислый анилин и люминесцируют светло-коричневым цветом при $\lambda=360$ нм, что свидетельствует о пигментации стенок веществами флавоноидной природы.

В базальной части рахиса основная паренхима сердцевины содержит мелкие простые крахмальные зерна до 9 мкм в диаметре, округлой формы. При облучении светом с $\lambda=360$ нм они не видны.

3.3. Морфолого-анатомическое исследование почек каштана конского обыкновенного

Анализ побегов каштана конского показал вариабельность размеров побеговых почек, что согласуется с литературными данными [39]. Наибольшие по размеру – апикальные почки. Они, как правило, генеративные и содержат в себе зачаточное соцветие. Размер апикальных почек зависит от возраста побега и экологических условий произрастания растения. Испытуемые образцы апикальных почек в среднем достигали в длину 2 см, в ширину 1,5 см. Боковые почки значительно уступали в размерах и достигали в среднем в длину 1 см, в ширину 0,5 см (рис. 22 А, Б).

Морфологический анализ почек позволил выявить основные особенности строения. Почки каштана плотные, с поверхности неопушенные, клейко-смолистые. Цвет их неоднородный, от темно-бурого до желто-зеленого. Кроющие чешуи - катафиллы расположены черепитчато (рис. 22 В).



Рисунок 22 - Морфология почки каштана: А - совокупность боковых почек на побеге; Б – совокупность апикальных почек; В– апикальная генеративная почка, вид с поверхности; Г – продольное сечение апикальной почки; Д – поперечные сечения апикальной почки. Обозначения: 1, 2 – срезы в апикальной части; 3 – срез медиальной части в области соцветия; 4 – срез в базальной части; 5 – срез в стеблевой части почки.

Анализ поперечных сечений почек позволил выявить особенности их морфологической организации. В частности, почкосложение почек полуобъемлющее (рис. 22 Г), листосложение - извилистое (рис. 22 Г-5). На базальных срезах осевой части почки визуализируется непучковый тип строения, характерный для стеблей древесных растений (рис. 22 Г-5).

При микроскопии в дневном свете кроющие чешуи на поперечном сечении бурые, с более светлой многослойной пробкой на поверхности. Проводящие пучки мелкие, неармированные. На поверхности почечных чешуй заметен слабоокрашенный смолянистый секрет, склеивающий чешуи между собой (рис. 23 А). Люминесцентный анализ на малом увеличении ($\times 100$) позволил обнаружить наибольшую интенсивность свечения именно склеивающего секрета на поверхности почечных чешуй (рис. 23 Б).

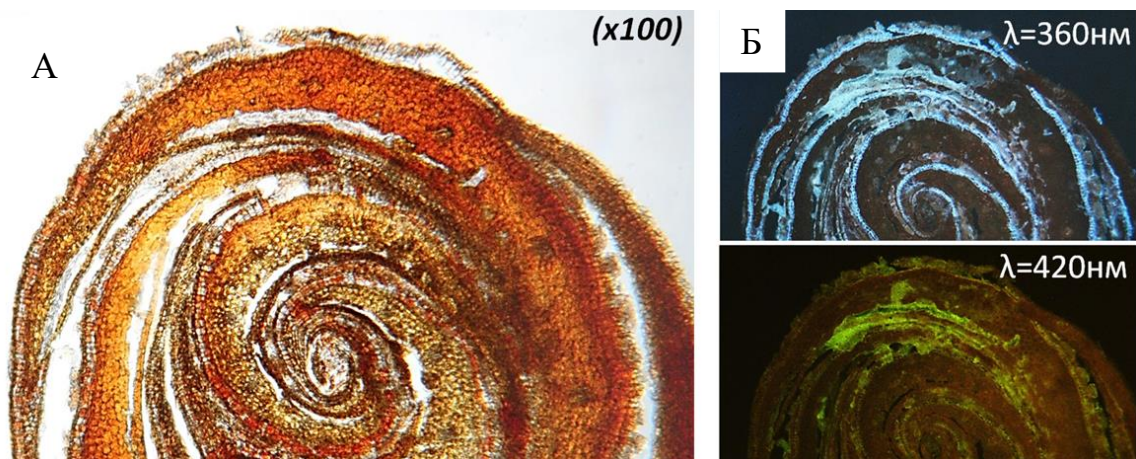


Рисунок 23 - Поперечное сечение в апикальной части почки каштана конского ($\times 100$): А – при дневном свете; Б – люминесценция тканей.

При облучении тканей на поперечных срезах УФ-светом с $\lambda=360$ нм смолянистый секрет светится светло-голубым цветом. Листовой мезофилл светится слабо и не заметен на темном фоне. При облучении светом с $\lambda=420$ нм смолянистый секрет люминесцирует светло-желтым цветом (рис. 23).

Анализ поверхности кроющих чешуй позволил обнаружить, что стороны чешуи опушены различно. С внешней стороны наружные почечные чешуи почти голые. На их поверхности, ближе к основанию, как правило,

локализованы одноклеточные бичевидные волоски. С внешней стороны чешуй эпидермис мелкоклеточный, сложен из угловатых паренхимных клеток. Клеточные стенки эпидермальных клеток бурого цвета (рис. 24).

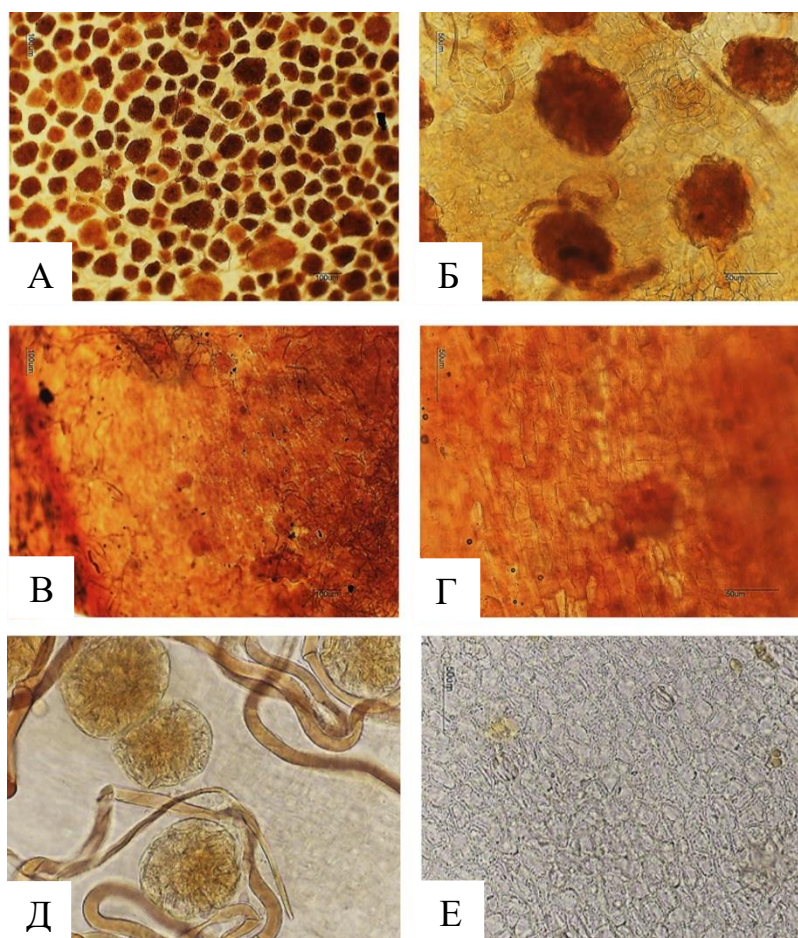


Рисунок 24 - Эпидермальные поверхности краевых кроющих чешуй почки каштана конского: А – внутренний эпидермис (x100); Б - внутренний эпидермис (x400); В - внешний эпидермис (x100); Г - внешний эпидермис (x400); Д – бичевидные волоски и железистые трихомы (x400); Е – клетки эпидермы с устьищем (x400).

Эпидермальная поверхность внутренней стороны кроющих чешуй густо покрыта крупными головчатыми трихомами – железками. Головки железок многоклеточные, с бурым содержимым. Клетки внутренней эпидермы тонкостенные, их целлюлозные клеточные стенки светло-желтого цвета. В эпидерме заметны устьичные аппараты анамоцитного типа. С внутренней стороны катафиллов, ближе к основанию чешуй, также встречаются бичевидные волоски.

На поперечных сечениях в апикальной части почки видно, что железистые трихомы сильно склеены смолянистым секретом. Анализ поперечного сечения УФ-светом с $\lambda=360$ нм обнаружил голубое свечение пробкового слоя под эпидермой кроющей чешуи и светло-голубое свечение смолянистого секрета. Структура железистой трихомы из-за густого смолянистого секрета не визуализируется (рис. 25).

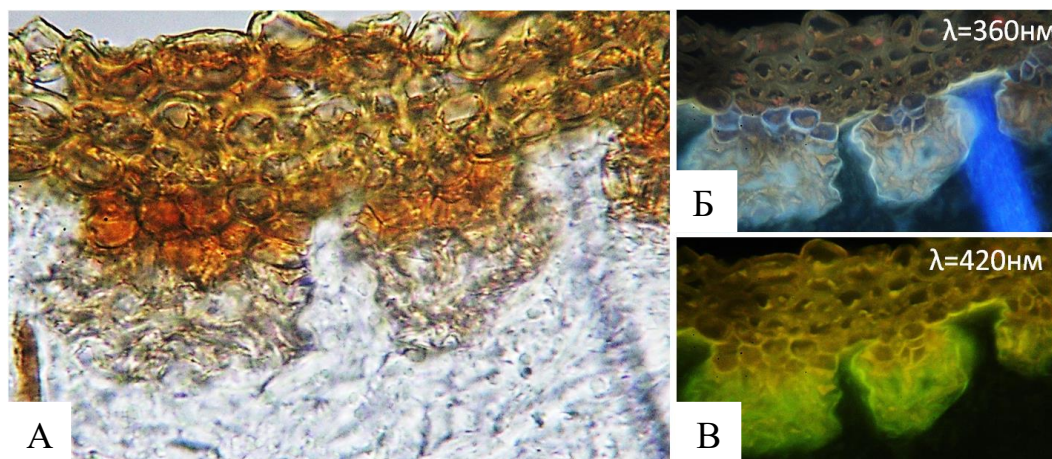


Рисунок 25 - Структура железистых трихом почки каштана конского со смоляным секретом. Поперечное сечение (x400): А – видимый свет; Б – люминесценция при облучении светом с $\lambda=360$ нм; В - люминесценция при облучении светом с $\lambda= 420$ нм.

Анализ поперечного сечения кроющей чешуи в медиальной части показал, что смолянистого секрета в этой области почки меньше, чем в апикальной части. Структура локализованных здесь железок хорошо диагностируется. Ножка железки многоклеточная, сложенная округлыми по форме клетками с бурым протопластом. Головка железки также многоклеточная, состоит из тонкостенных смятых клеток с аморфным, слабо окрашенным протопластом (рис. 25 А). Железки при облучении УФ светом ($\lambda=360$ нм) ярко люминесцируют голубым цветом, что может свидетельствовать о содержании в протопласте кумариновых соединений, для которых характерна ярко-голубая люминесценция (рис. 25 Б). При облучении железок светом с $\lambda= 420$ нм клетки ножки светятся бурым цветом, головки – желтым (рис. 25 В).

Бичевидные волоски, описанные ранее для кроющих чешуй, также способны к люминесценции. При этом неструктурированный протопласт бичевидных волосков люминесцирует одинаково бурым цветом как при $\lambda=360$ нм, так и при $\lambda=420$ нм.

Как уже отмечалось выше, пробковый слой кроющей чешуи почки каштана при облучении светом с $\lambda=360$ нм активно люминесцирует ярко-голубым цветом. При этом люминесценция хорошо заметна даже при микроскопировании на светлом поле микроскопа в проходящем свете.

Всего в структуре почки каштана насчитывается до 8-ми кроющих чешуй. Внутренний слой чешуй представлен крупными светлыми по окраске клетками эпидермы. С поверхности эпидермис чешуй аналогичен таковому на внешних катафиллах. Опушение внутренних кроющих чешуй подобно опушению наружных, однако встречаемость железистых трихом значительно ниже. Бичевидные волоски, напротив, густо покрывают адаксиальные поверхности катафиллов.

В основании почек кроющие чешуи наиболее грубые и темно окрашенные. Их гистология аналогична описанным, однако у кроющих чешуй при основании почки люминесцированию подвержены не только пробковые слои, но и паренхима мезофилла.

Примордии, зачаточные листья почки каштана, упакованы под кроющими чешуями особым образом. Листочки примордиев сложены пополам по центральной жилке. Их листовые пластинки волнообразно смяты по вторичным жилкам. Листовые пластинки сильно опушены бичевидными многоклеточными волосками с темно-бурым протопластом клеток (рис. 26 А).

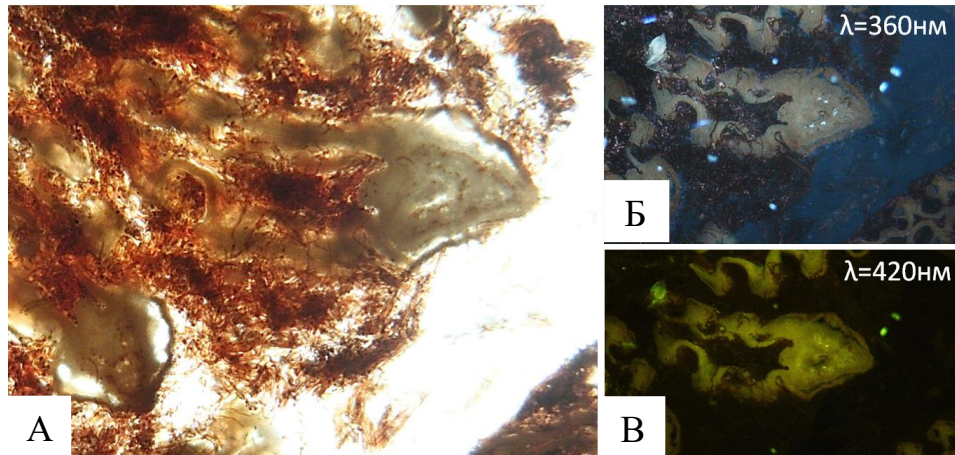


Рисунок 26 - Примордии почки каштана конского на поперечном сечении (x100): А – видимый свет; Б – люминесценция при облучении светом с $\lambda=360$ нм; В - люминесценция при облучении светом с $\lambda=420$ нм.

При облучении примордиев УФ светом с $\lambda=360$ нм они люминесцируют светло-серым цветом, это в основном ткани самого листа: эпидермис, мезофилл. Проводящие элементы за счет лигнифицированных оболочек жилок светятся голубым цветом (рис. 26 Б). При облучении примордиев светом с $\lambda=420$ нм люминесценция всех тканей примордия желтого цвета. Необходимо отметить, что бичевидные волоски примордиев при аналогичных условиях облучения люминесцируют слабо (рис. 26 Б).

Люминесценция протопластов в клетках бичевидных волосков хорошо визуализируется на большом увеличении (x400). Протопласты при видимом свете темно-бурого цвета практически не изменяют окраски при облучении светом с $\lambda=360$ нм и $\lambda=420$ нм. При этом клеточные стенки слабо светятся голубым цветом (рис. 26 Б, В).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. В результате морфологического и анатомо-гистологического исследования были уточнены и дополнены уже известные характерные особенности строения семян каштана конского. Впервые проведено изучение петиолярной анатомии листьев каштана конского, а также выявлены диагностически значимые признаки почек каштана конского как перспективного источника новых лекарственных растительных средств.
2. Для семян каштана конского были впервые определены следующие характерные признаки, выявленные с использованием метода люминесцентной микроскопии при облучении УФ-светом с длинами волн $\lambda=360$ нм и $\lambda=420$ нм:
 - крупные коллатеральные пучки овальной формы внутренней части семенной кожуры, расположенные неравномерно в один ряд. Темно-коричневые сосуды ксилемы имеют голубую люминесценцию ($\lambda=360$ нм); клеточные стенки флоэмной ткани светятся желтым ($\lambda=420$ нм) и голубым ($\lambda=360$ нм) цветом;
 - слабая люминесценция оболочек клеток эпидермы семенной кожуры при $\lambda=360$ нм и ярко-желтая при $\lambda=420$ нм. Протопласт клеток имеет голубое свечение;
 - люминесценция при освещении УФ-светом клеточных стенок паренхимы семенной кожуры - темно-красная ($\lambda=360$ нм), протопласта клеток паренхимы кожуры - ярко-голубая ($\lambda=360$ нм); при $\lambda=420$ нм протопласт вместе с оболочкой имеет ярко-желтое свечение;
 - наличие в паренхиме семядолей простых и сложных крахмальных зерен неправильной округло-грушевидной формы, а также неструктурированного алейрона. Клетки паренхимы имеют незначительное голубое ($\lambda=360$ нм) и желтое ($\lambda=420$ нм) свечение.

3. Впервые определены особенности петиолярной анатомии листьев каштана конского:

- очертания поперечных сечений: базальная часть имеет С-образное очертание с округло-выгнутой абаксиальной и вогнутой адаксиальной стороной черешка; медиальная часть почти овальной формы с равномерно волнистой поверхностью; апикальная часть имеет неправильную угловатую форму с неоднородной волнистостью поверхности;
- наличие центральной группы пучков в сердцевине; колленхимоподобная паренхима коровой части;
- пигментированные клетки сердцевинны;
- наличие простых крахмальных зерен;
- люминесценция светло-голубым цветом при $\lambda=360$ нм и желтым – при $\lambda=420$ нм кутикулы эпидермы, пигментов в клетках флоэмы и ксилемы, лигнифицированных клеток склеренхимы, пигментированных клеток сердцевинны.

4. Впервые выявлены диагностически значимые признаки почек каштана конского, позволяющие подтверждать их подлинность как лекарственного растительного сырья:

- размеры почек, варьирующие от одного до двух см в длину и до полутора см в ширину; форма почек – вытянуто-яйцевидная, заостренная;
- наличие полуобъемлющего почкосложения и извилистого листосложения;
- наличие фрагментов опушенных складчатых примордиев и остатков соцветий в медиальной части почки;
- присутствие в базальной части лучистой ксилемы с радиальными сердцевинными лучами и С-образных фрагментов склеренхимы, расположенных по кругу от флоэмы.

5. Диагностически значимые признаки, выявленные в ходе исследования, рекомендованы для включения в раздел «Микроскопические признаки» проекта фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья – «Каштана конского обыкновенного почки».

ГЛАВА 4. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОРГАНОВ КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО

Наиболее изученным на сегодняшний день является сапониновый состав семян каштана конского. Также является актуальным исследование химического состава различных органов надземной части растения. Это подтверждается рядом работ, посвященных изучению и стандартизации листьев, коры, экзокарпия каштана конского [25, 34, 65, 47, 28, 63, 66, 62]. Согласно этим данным, можно сделать вывод о наличии в органах каштана высокого содержания сапонинов и веществ фенольной природы (флавоноидов, кумаринов).

Особый интерес представляют почки каштана конского, химический состав которых практически не изучен, и введение которых в фармацевтическую практику позволит более рационально использовать фитомассу растения для создания лекарственных растительных средств.

Для подтверждения присутствия флавоноидных соединений в коре, цветках, экзокарпии плодов, семенах, почках каштана конского использовали цветные качественные реакции. Помимо этого, для определения качественного состава были проведены исследования хроматографическим и спектрофотометрическим методами.

4.1. Сравнительное изучение надземных органов каштана конского обыкновенного

Были проанализированы методом ТСХ в целях сравнения спиртовые извлечения из коры, цветков, экзокарпия плодов, семян, почек каштана конского в системе хлороформ:этанол 19:1 (рис. 27).

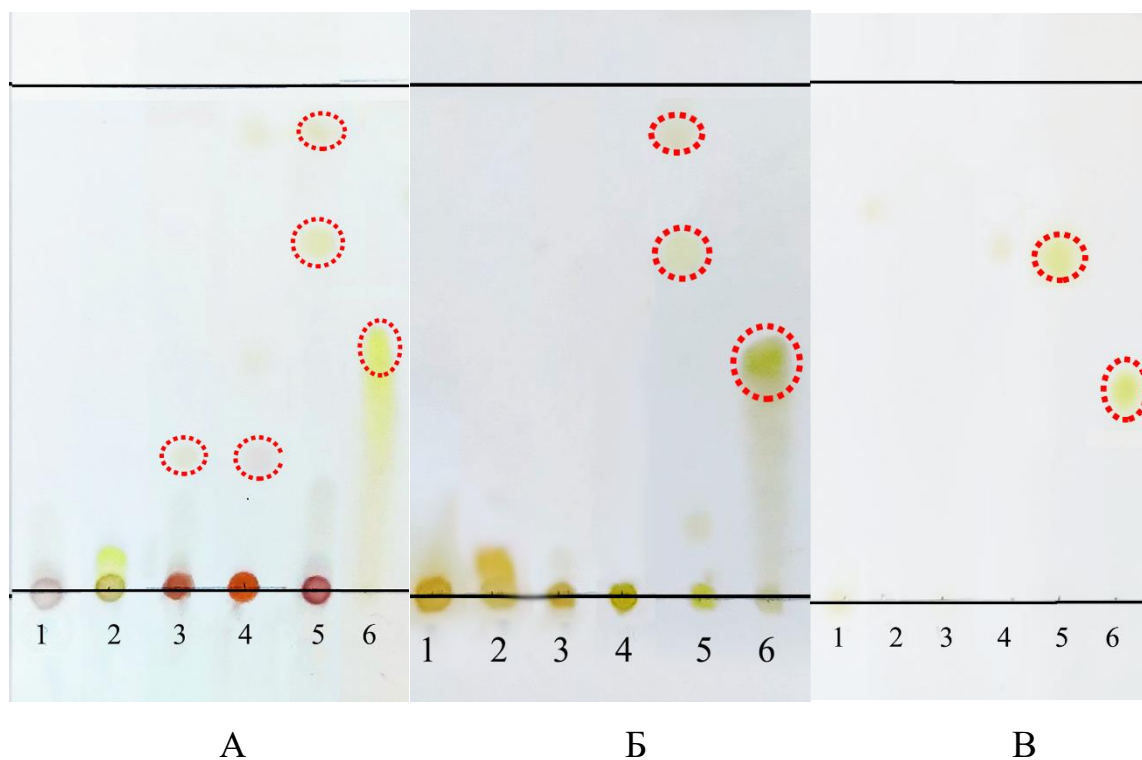


Рисунок 27 - Хроматограммы извлечений из различных органов каштана конского обыкновенного (хлороформ:этанол 19:1): А – обработка раствором ФВК; Б – обработка щелочным раствором ДСК; В – обработка раствором хлорида алюминия (III).

Обозначения: 1 – извлечение из коры; 2 – извлечение из цветков; 3 – извлечение из экзокарпия; 4 – извлечение из семян; 5 – извлечение из почек; 6 – ГСО лютеолина.

На хроматограмме, обработанной ФВК, четко обнаруживаются розовые пятна с $R_f \approx 0,3$ у извлечений из экзокарпия и семян, что соответствует содержанию в объектах сапонинов; помимо этого определяются пятна желтого цвета с $R_f \approx 0,7$ и $R_f \approx 0,9$ для извлечения из почек и пятно с $R_f \approx 0,5$ для ГСО лютеолина.

После обработки хроматограммы реактивом ДСК выявляются аналогичные желтые пятна с $R_f \approx 0,7$ и $R_f \approx 0,9$ для извлечения из почек, что свидетельствует о фенольной природе данных веществ. Обработка раствором алюминия хлорида (III) позволяет определить вещество флавоноидной природы ($R_f \approx 0,7$) в извлечении из почек.

Детекция пятен в УФ свете при длинах волн 254 нм и 366 нм подтверждает указанные факты.

Таким образом, можно сделать вывод о перспективности изучения флавоноидного состава почек каштана конского обыкновенного, в связи с чем дальнейшая работа была сосредоточена именно на данном объекте.

4.2. Выделение индивидуальных веществ из почек каштана конского обыкновенного

Для изучения химического состава почек каштана конского и для препаративного выделения веществ в индивидуальном виде был использован метод адсорбционной колоночной хроматографии [26].

В качестве исходного материала для нанесения на сорбент использовался хлороформный экстракт из почек каштана конского обыкновенного, полученный методом циркуляционной экстракции в аппарате Сокслета.

Экстракт из почек каштана конского упаривали под вакуумом до густого остатка (около 100 мл), смешивали с 30 г силикагеля (силикагель L 40/100 КСКГ измельченный, фр. 0,04 – 0,10 мм), высушивали и вносили в колонку в виде взвеси в хлороформе. Вещества элюировали в градиентном режиме смесью хлороформа и этилового спирта (табл. 4).

Таблица 4 - Последовательность элюирования экстракта из почек каштана

Хлороформ, %	Спирт, %	Объем, мл	Номера фракций
100	0	500	1, 2
99	1	1300	3-12
98	2	1000	13-20
97	3	1500	21-32
95	5	500	33-38
93	7	500	39-46
90	10	500	47-50
85	15	500	51-53
80	20	500	54-57
70	30	500	58-61
60	40	500	62-64
0	100	500	65-70

Затем хроматографическую колонку элюировали дистиллированной водой объемом около 500 мл и проводили упаривание полученных элюатов на водяной бане. Упаренные фракции переносили в емкости с маркировками и продолжали упаривать с помощью вакуумно-роторного выпарителя до объема около 10 мл.

Контроль за ходом элюирования и разделения фракций проводили визуально, оценивая насыщенность раствора, а также с использованием метода ТСХ на пластинках «Сорбфил ПТСХ–АФ–А–УФ» в системах растворителей хлороформ:этанол (19:1) и *n*-бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:2). Хроматограммы рассматривали в УФ-свете ($\lambda=366$ нм и 254 нм), затем проводили обработку щелочным раствором ДСК. Фракции, содержащие наибольшее количество веществ, подвергали очистке путем перекристаллизации.

4.3. Идентификация выделенных индивидуальных веществ

Были отобраны, фракции содержащие доминирующие вещества почек каштана конского. Фракции с соединением **1** (фракции 5-12, элюент – хлороформ:этанол 99:1), объединяли и подвергали очистке методом перекристаллизации смесью хлороформа с этанолом. Элюаты, содержащие соединение **2** (фракции 13-18, элюент – хлороформ:этанол 98:2), также объединяли и подвергали очистке методом перекристаллизации смесью хлороформа с этанолом.

Определение структуры выделенных веществ проводили методами ТСХ, УФ-спектрофотометрии, масс-спектрального анализа и ЯМР.

Спектральные характеристики ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C получали с помощью прибора «Bruker AM 300» (300 МГц), масс-спектральные характеристики получали с использованием масс-спектрометра «Kratos MS-30», УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena).

Соединения **1** и **2** идентифицированы нами на основании данных УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР- и масс-спектров как рамноцитрин (7-О-метилкемпферол)

[89] и 7,4'-диметилкемпферол [38] соответственно.

Рамноцитрин (3,5,4'-тригидрокси-7-метоксифлавоон) (рис. 28) (1). Кристаллическое вещество желтого цвета состава $C_{16}H_{12}O_6$, т. пл. 220-223 °С (смесь хлороформа и этилового спирта). λ_{max} EtOH 274 и 375 нм; + NaOAc 274, 375 нм; + NaOAc + H_3BO_3 274, 376 нм; + $AlCl_3$ 280, 424 нм; + $AlCl_3$ + HCl 280, 424 нм; + NaOMe 253, 277, 434 нм.

1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 3.88 (3H, с, CH_3O), 6.35 (1H, д, 2 Гц, H-6), 6.73 (1H, д, 2 Гц, H-8), 6.93 (2H, д, 9 Гц, H-3' и H-5'), 8.08 (2H, д, 9 Гц, H-2' и H-6'), 12.37 (1H, с, 5-ОН группы).

^{13}C -ЯМР спектр (126,76 МГц, ДМСО- d_6 , δC , м.д.): C-2 (145.29), C-3 (136.03), C-4 (176.08), C-5 (161.17), C-6 (92.06), C-7 (164.94), C-8 (97.51), C-9 (156.14), C-10 (104.08), C-1' (121.62), C-2' и C-6' (129.63), C-3' и C-5' (115.50), C-4' (159.37), CH_3O при C-7 (55.07).

Масс-спектр (EI-MS, 180 °С, m/z): M^+ 300 (100 %), 257 (17 %), 167 (8 %), 121 (50 %).

7,4'-диметилкемпферол (3,5-дигидрокси-7,4'-диметоксифлавоон) (рис. 28) (2). Кристаллическое вещество светло-желтого цвета состава $C_{17}H_{14}O_6$, т. пл. 175-178 °С (смесь хлороформа и этилового спирта). λ_{max} EtOH 260, 370 нм; + NaOAc 256, 370; + NaOAc + H_3BO_3 256, 370; + $AlCl_3$ 272, 420; + $AlCl_3$ + HCl 272, 420; NaOMe 275, 382 нм.

1H -ЯМР спектр (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 3,85 (с, 3H, CH_3O при C-4¹), 3,88 (с, 3H, CH_3O при C-7), 6,36 (1H, д, 2 Гц, H-6), 6,73 (1H, д, 2 Гц, H-8), 7,13 (2H, д, 9 Гц, H-3¹ и H-5¹), 8,18 (2H, д, 9 Гц, H-2¹ и H-6¹), 12,38 (1H, с, 5-ОН группы).

^{13}C -ЯМР спектр (126,76 МГц, ДМСО- d_6 , δC , м.д.): C-2 (148,44), C-3 (136,58), C-4 (176,08), C-5 (160,64), C-6 (92,15), C-7 (164,94), C-8 (97,54), C-9 (156,17), C-10 (104,13), C-11 (123,21), C-2¹ и C-6¹ (129,43), C-3¹ и C-5¹ (114,08), C-4¹ (169,40), CH_3O при C-7 (56,10), CH_3O при 4¹ (55,42).

Масс-спектр (EI-MS, 180 °С, m/z): M^+ 314 (65 %), 271 (8 %), 167 (4 %),

135 (15 %).

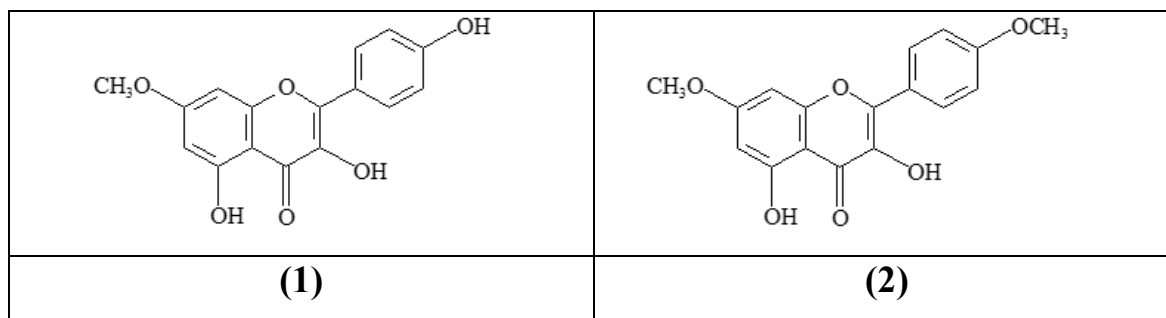


Рисунок 28 - Структурные формулы рамноцитрина (1) и 7,4'-диметилкемпферола (2).

В ^1H -ЯМР-спектрах обоих флавоноидов присутствуют по два двухпротонных дублетных сигнала с константами спин-спинового взаимодействия (КССВ) 9 Гц, характерных для протонов Н-3' и Н-5', а также протонов Н-2' и Н-6' (рис. 29 и рис. 30). Кроме того, наличие в ^1H -ЯМР-спектрах обоих флавоноидов сигналов протонов Н-6 и Н-8 с КССВ 2 Гц свидетельствует о замещении кольца А в положениях С-5 и С-7. Наличие свободной 5-ОН-группы в соединениях 1 и 2 подтверждается однопротонными синглетными сигналами при 12,37 м.д. и 12,38 м.д. соответственно.

Флавоиноидная структура рамноцитрина, а также наличие метоксильной группы при С-7 в молекуле данного вещества подтверждается данными ^{13}C -ЯМР-спектра, который содержит характерные сигналы, в том числе при (55,07 м.д.) (рис. 31).

Наличие в масс-спектре пика молекулярного иона с m/z 300, а также характер фрагментации масс-спектра - пики ионов с m/z 121 (кольцо В) и 167 (кольцо А) подтверждают наличие метоксигруппы при С-7 молекулы флавоноида 1 [100]. Наличие в масс-спектре пика молекулярного иона с m/z 314, а также характер фрагментации масс-спектра - пики ионов с m/z 135 (кольцо В) и 167 (кольцо А) подтверждает наличие двух метоксигрупп при С-7 и С-4' молекулы флавоноида 2.

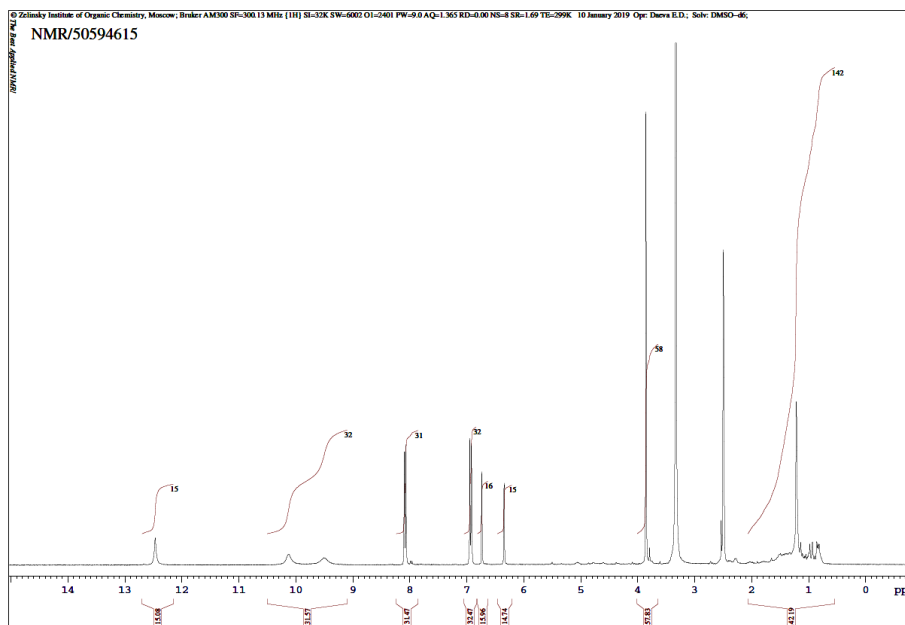


Рисунок 29 - ^1H -ЯМР-спектр рамноцитрина (1) в DMSO-d_6 .

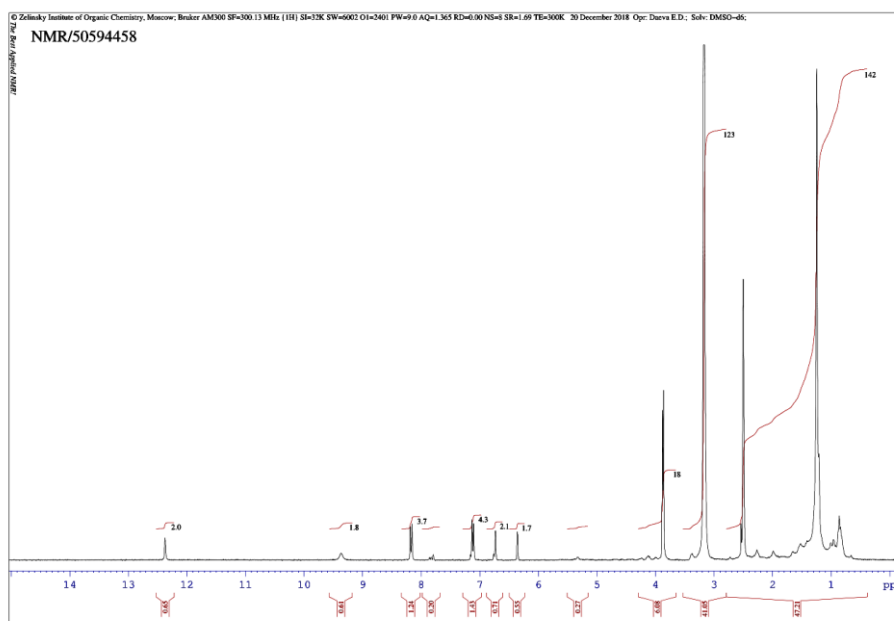


Рисунок 30 - ^1H -ЯМР-спектр 7,4'-диметилкемпферола (2) в DMSO-d_6 .

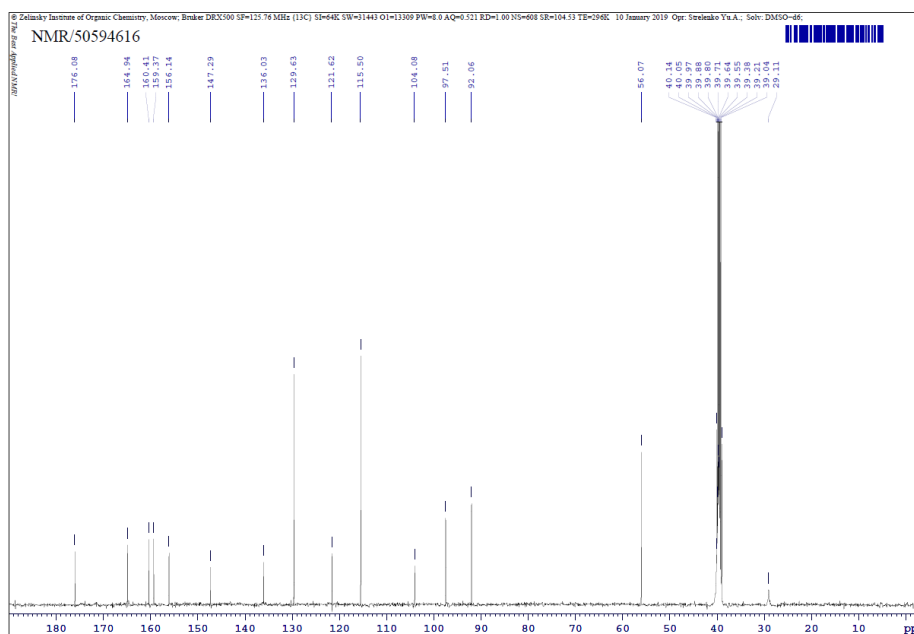


Рисунок 31 - ^{13}C -ЯМР-спектр рамноцитрина (1) в DMSO-d_6 .

Результаты исследований УФ-спектров флавоноида 1 в присутствии ионизирующих и комплексообразующих добавок (NaOAc , H_3BO_3 , AlCl_3 , NaOMe) [104] свидетельствуют о том, что в молекуле данного флавоноида свободные OH -группы находятся в положениях C-3 , C-5 и $\text{C-4}'$. Данные УФ-спектров флавоноида 2 свидетельствуют о наличии в положениях C-3 и C-5 . Данные УФ-спектров флавоноидов 1 и 2 в совокупности с данными масс-спектрометрии, включая характерную фрагментацию, свидетельствуют о метилировании 7-OH -группы в соединении 1, а также о метилировании 7-OH -группы и $4'\text{-OH}$ -группы в соединении 2 (рис. 32 и рис. 33).

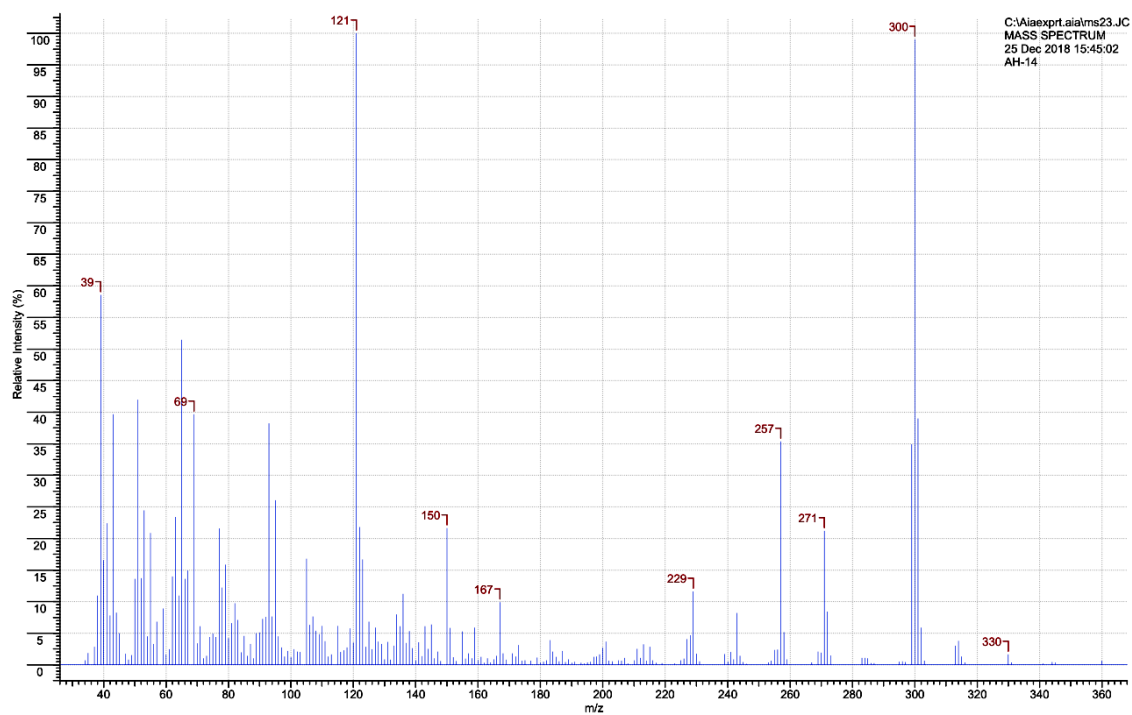


Рисунок 32 - Масс-спектр (EI-MS) рамноцитрина (1).

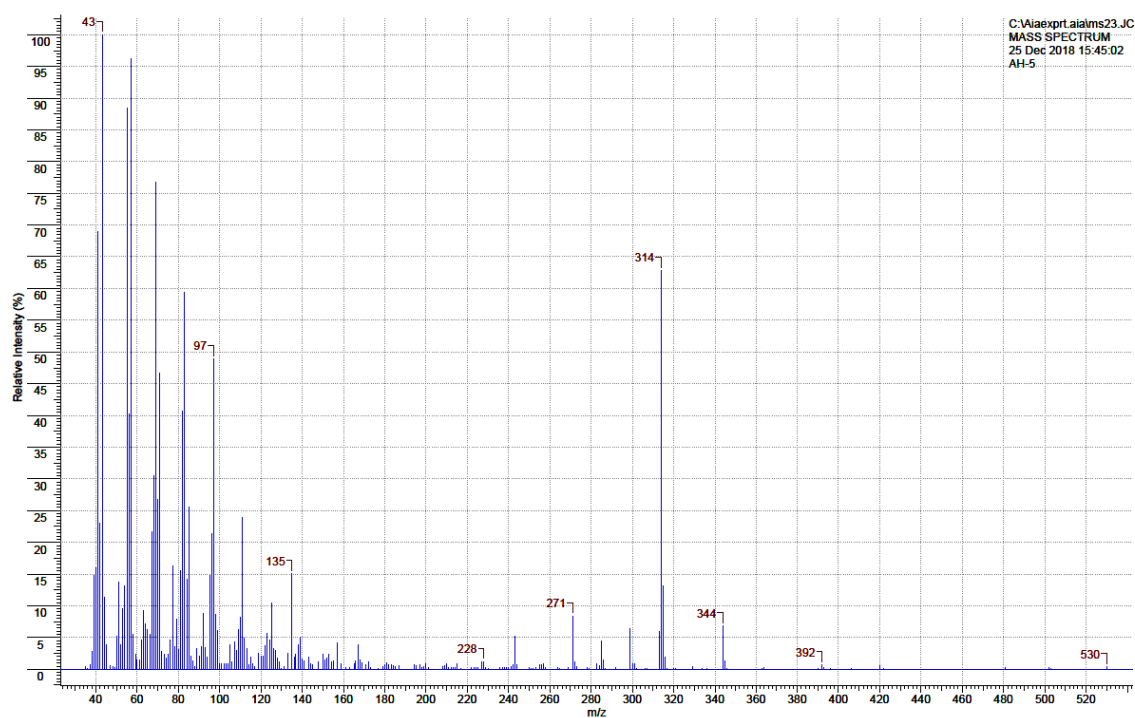


Рисунок 33 - Масс-спектр (EI-MS) 7,4'-диметилкемпферола (2).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Проведено сравнительное фитохимическое исследование почек, коры, цветков, семян и экзокарпия плодов каштана конского, которое позволило выявить перспективность изучения флавоноидного состава почек данного растения.
2. В ходе исследования методом тонкослойной хроматографии в извлечении из почек каштана конского было обнаружено вещество с величиной R_f около 0,7, которое отсутствует в остальных органах растения. Далее в ходе колоночной хроматографии данное доминирующее вещество почек каштана конского идентифицировано как рамноцитрин (3,4'-дигидрокси-7-метоксифлавоон, или 7-О-метилкемпферол).
3. Из почек каштана конского помимо рамноцитрина выделен также близкий по характеристикам флавоноид 7,4'-диметилкемпферол. Рамноцитрин и 7,4'-диметилкемпферол впервые выделены из почек каштана конского и идентифицированы с использованием УФ-спектрофотометрии, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ПОЧЕК КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО

В рамках введения в фармацевтическую практику нового вида лекарственного растительного сырья – каштана конского почки – необходима разработка методик качественного и количественного анализа. В ходе текущего диссертационного исследования из почек каштана был выделен доминирующий компонент флавоноидной природы – рамноцитрин. Данное вещество является диагностически значимым для почек каштана конского, следовательно, именно на него следует опираться при разработке методик качественного и количественного анализа почек каштана конского обыкновенного.

5.1. Разработка методик качественного анализа почек каштана конского обыкновенного

Рамноцитрин является флавоноидом, соответственно, для него характерны цветные реакции, направленные на определение флавоноидов: цианидиновая реакция, проба Брианта, реакция с алюминия хлоридом (III). Помимо этого, в дополнение к цветным реакциям на наш взгляд целесообразно использовать методы ТСХ с применением стандартного образца лютеолина и УФ-спектрофотометрии с последующей интерпретацией спектральных характеристик.

5.1.1. Качественный анализ почек каштана конского обыкновенного методом тонкослойной хроматографии

Метод ТСХ позволяет достоверно определить наличие в извлечениях из почек каштана конского диагностически значимого компонента – рамноцитрина. Разработка методики качественного определения заключалась в подборе условий хроматографирования и детектирования.

Оптимальной системой для хроматографирования является смесь растворителей хлороформ:этанол в соотношении 19:1. В данной системе рамноцитрин обнаруживается на хроматограмме в виде зоны вещества с R_f около 0,7.

По причине отсутствия стандартного образца рамноцитрина нет возможности использовать данное вещество в качестве свидетеля при определении подлинности почек каштана конского обыкновенного. Нами предложено использование стандартного образца лютеолина, как близкого рамноцитрину по химической природе вещества. В указанных условиях хроматографирования лютеолин обнаруживается в виде зоны вещества с R_f около 0,5.

Определение зон веществ на хроматограмме осуществлялась визуально при дневном свете, а также при просмотре в УФ-свете при $\lambda=254$ нм и $\lambda=366$ нм. Для проявления флавоноидов пластинки обрабатывают спиртовым (96%) раствором алюминия хлорида (III). Схема полученной хроматограммы представлена на рис. 34.

Далее проводится расчет относительного показателя R_{st} , который равен отношению коэффициента удерживания (R_f) рамноцитрина к коэффициенту удерживания лютеолина. Данный показатель должен равняться 1,4.

$$R_{st} = \frac{R_f(\text{рамноцитрин})}{R_f(\text{лютеолин})} = \frac{0,7}{0,5} = 1,4$$

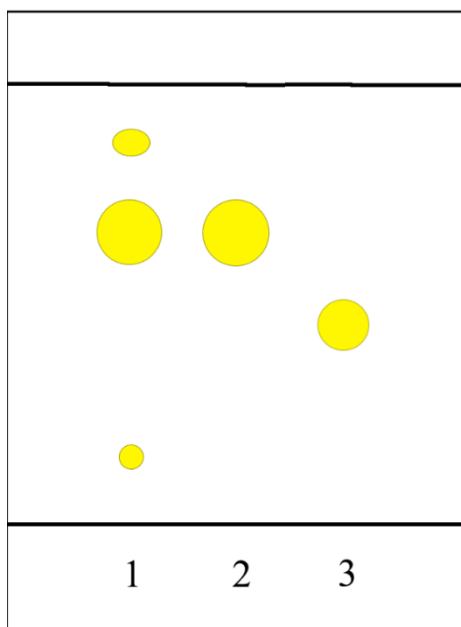


Рисунок 34 – Схема хроматограммы водно-спиртового извлечения из почек каштана конского обыкновенного. Система хлороформ:этанол 19:1.

Обработка спиртовым раствором алюминия хлорида (III).

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из почек каштана конского; 2 – СО рамноцитрина; 3 – ГСО лютеолина.

Разработанная методика включена в проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Каштана конского обыкновенного почки» (приложение 4).

5.1.2. Качественный анализ почек каштана конского обыкновенного методом УФ-спектрофотометрии

Извлечение из почек каштана конского в объеме 1 мл переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят до метки 70% спиртом. Оптическую плотность полученного раствора оценивают на фоне 70% этилового спирта.

Полученный спектр почек каштана конского имеет максимумы поглощения при длине волны 280 ± 2 нм, 340 ± 2 нм, 420 ± 2 нм (рис. 35). В случае добавления к раствору 2% спиртового раствора алюминия хлорида (III) на электронном спектре наблюдается батохромный сдвиг максимумов поглощения (рис. 35), что также является качественной характеристикой

веществ флавоноидной природы.

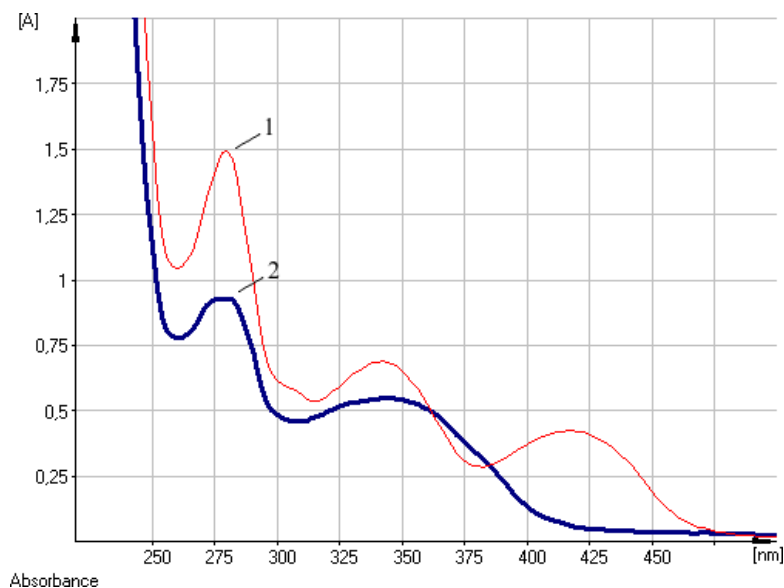


Рисунок 35 - Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения из почек каштана конского обыкновенного.

Обозначения: 1- извлечение; 2 –извлечение с добавлением алюминия хлорида

5.2. Разработка методик количественного анализа почек каштана конского обыкновенного

Для целей количественного определения компонентов ЛРС (в частности, флавоноидов) классическим методом является метод УФ-спектрофотометрии, предлагаемый ГФ РФ XIV [17]. Также в последнее время в целях стандартизации активно используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, который позволяет проводить одновременно качественный и количественный анализ [4, 112, 17]. Данные методы являются довольно простыми в применении, но при этом способны обеспечить достаточную точность определения. Соответственно, в рамках разработки нового вида ЛРС необходимо изучение возможности использования указанных методов для количественного определения данного вида сырья.

5.2.1. Количественное определение суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного методом дифференциальной спектрофотометрии

Одним из доминирующих флавоноидов почек каштана является флавоноид рамноцитрин. Анализ УФ-спектров рамноцитрина показал, что раствор вещества при добавлении алюминия хлорида имеет максимум поглощения при $\lambda=422$ нм (рис. 37). В УФ-спектре водно-спиртового извлечения из почек (дифференциальный вариант) также обнаруживается максимум поглощения при $\lambda=422$ нм (рис. 38), что соответствует максимуму поглощения раствора рамноцитрина (рис. 39). Отсюда следует вывод, что именно рамноцитрин в большей части определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из почек каштана конского обыкновенного (рис. 36-рис. 39), особенно в дифференциальном варианте (рис. 38 и рис. 39). Следовательно, рамноцитрин является диагностически значимым флавоноидом для данного вида сырья. Таким образом, целесообразным является определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на рамноцитрин при $\lambda=422$ нм.

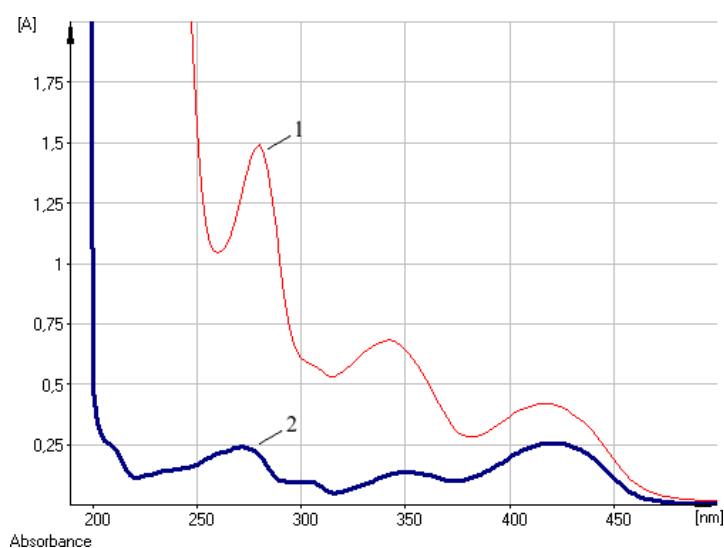


Рисунок 36 - Электронные спектры водно-спиртового извлечения из почек каштана конского обыкновенного (1) и спиртового раствора рамноцитрина (2) с добавлением алюминия хлорида.

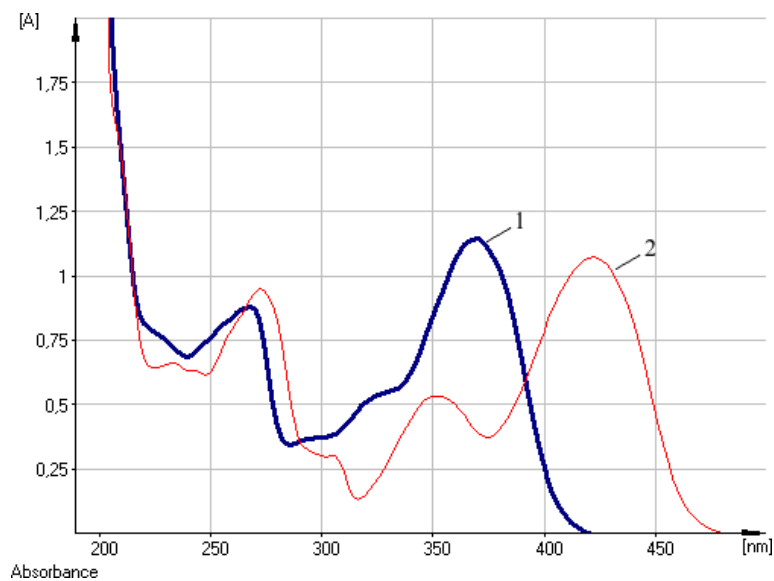


Рисунок 37 - Электронные спектры спиртовых растворов рамноцитрина.

Обозначения: 1 - исходный раствор; 2 – раствор с добавлением алюминия хлорида.

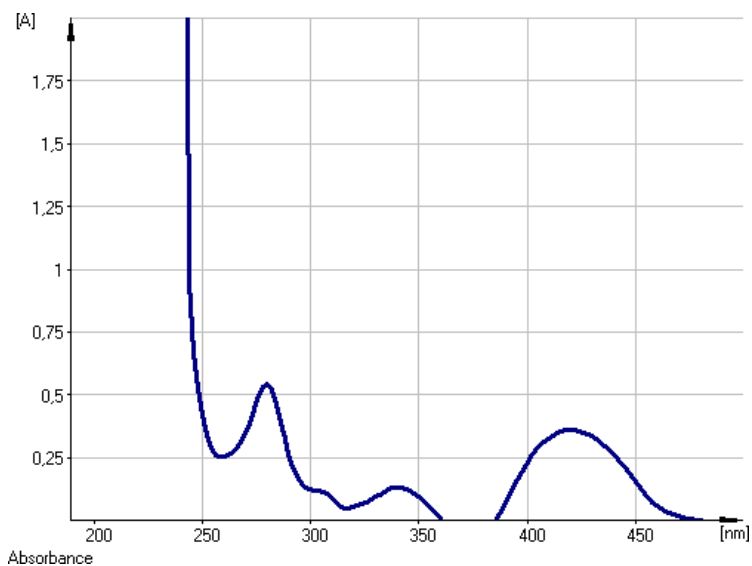


Рисунок 38 - Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения из почек каштана конского (дифференциальный вариант).

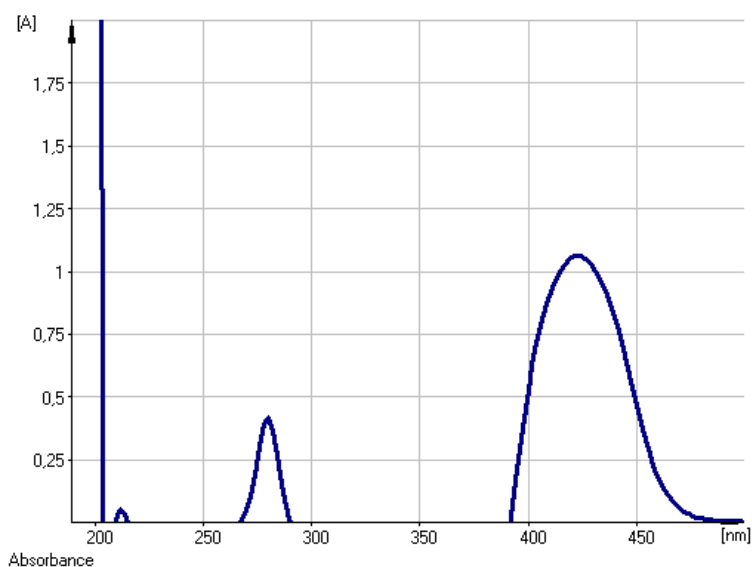


Рисунок 39 - Электронный спектр спиртового раствора рамноцитрина (дифференциальный вариант).

Проводилось исследование влияния различных параметров экстракции на выход флавоноидов как потенциальных БАС из сырья. С использованием УФ-спектрофотометрии определялось количественное содержание флавоноидов в пересчете на рамноцитрин в извлечениях из почек в зависимости от степени измельченности сырья, концентрации экстрагента, времени экстракции, соотношения сырье:экстрагент (табл. 5). Были определены оптимальные условия экстракции флавоноидов из почек каштана конского: экстрагент 70% этиловый спирт; соотношение «сырьё-экстрагент» – 1:50; время экстракции – извлечение на кипящей водяной бане в течение 60 мин (табл. 5). В ходе разработки методики было экспериментально определено теоретическое значение удельного показателя поглощения РСО рамноцитрина, равное 260.

Таблица 5 - Зависимость полноты извлечения суммы флавоноидов из почек каштана конского

№ п/п	Экстрагент	Соотношение сырье:экстрагент	Время экстракции, мин	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рамноцитрин и абсолютно сухое сырье (в %)
1.	40% этиловый спирт	1:50	60 мин	1,44±0,02
2.	50% этиловый спирт	1:50	60 мин	1,39±0,03
3.	60% этиловый спирт	1:50	60 мин	1,67±0,03
4.	70% этиловый спирт	1:50	60 мин	2,31±0,03
5.	80% этиловый спирт	1:50	60 мин	2,05±0,03
6.	96% этиловый спирт	1:50	60 мин	1,91±0,04
7.	70% этиловый спирт	1:50	30 мин	2,04±0,02
8.	70% этиловый спирт	1:50	45 мин	1,84±0,01
9.	70% этиловый спирт	1:50	60 мин	2,20±0,01
10.	70% этиловый спирт	1:50	75 мин	1,77±0,01
11.	70% этиловый спирт	1:50	90 мин	2,13±0,02
12.	70% этиловый спирт	1:50	105 мин	1,98±0,01
13.	70% этиловый спирт	1:50	120 мин	2,07±0,02
14.	70% этиловый спирт	1:30	60 мин	1,88±0,02
15.	70% этиловый спирт	1:50	60 мин	2,20±0,01
16.	70% этиловый спирт	1:100	60 мин	2,22±0,02

Методика количественного определения суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу

закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса). Испытуемый раствор готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 96% спиртом этиловым (испытуемый раствор А). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 422 нм через 30 минут после приготовления. В качестве раствора сравнения используют раствор, полученный следующим образом: 1 мл извлечения (1:50) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96% до метки.

Примечание: *Приготовление раствора рамноцитрина - рабочего стандартного образца.* Около 0,025 (точная навеска) рамноцитрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл 96% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 96% этиловым спиртом до метки (раствор А рамноцитрина). 1 мл раствора А рамноцитрина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 96 % спиртом этиловым (испытуемый раствор Б рамноцитрина). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 422 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, который готовят следующим образом: 1 мл раствора А рамноцитрина помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% (раствор сравнения Б рамноцитрина).

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рамноцитрин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{D * m_0 * 25 * 25 * 1 * 100 * 100}{D_0 * m * 25 * 25 * (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора РСО рамноцитрина;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса РСО рамноцитрина, г;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

В случае отсутствия стандартного образца рамноцитрина возможно использование теоретического значения удельного показателя поглощения – 260.

$$x = \frac{D * 25 * 25 * 100}{m * 260 * (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса РСО рамноцитрина, г;

260 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) РСО рамноцитрина при 422 нм;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного отражены в табл. 6. Статистическая обработка проведенной серии экспериментов позволила рассчитать ошибку единичного определения (для варианта с использованием теоретического значения удельного показателя поглощения), которая составила $\pm 2,23\%$ с доверительной вероятностью 95% (табл. 6).

Таблица 6 - Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного

f	\bar{X}	S	$P, \%$	$t(P, f)$	$\pm X$	$E, \%$
10	2,24	0,0224	95	2,23	$\pm 0,0152$	$\pm 2,23$

Для валидационной оценки методики определялись показатели специфичности, линейности, правильности и воспроизводимости. Специфичность методики подтверждалась соответствием на УФ-спектрах максимума поглощения комплекса флавоноидов почек каштана конского и максимума поглощения рамноцитрина.

Линейность методики определялась для серии растворов рамноцитрина (с концентрациями в диапазоне от 0,00345 до 0,03105 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99986, что свидетельствует о линейности разработанной методики.

Правильность методики определялась методом добавок. Растворы рамноцитрина известной концентрации (25%, 50% и 75%) добавляли к испытуемому раствору и проводили количественное определение. При этом средний процент восстановления составил 98%.

Разработанная методика была применена для анализа образцов почек каштана конского (табл. 7), в ходе которого определена вариабельность содержания суммы флавоноидов в образцах (от $1,24 \pm 0,01\%$ до $2,31 \pm 0,01\%$). Результаты позволяют рекомендовать в качестве нижнего предела для почек каштана конского содержание суммы флавоноидов не менее 1,0%.

Таблица 7 - Содержание суммы флавоноидов в образцах почек каштана конского обыкновенного

№ п/п	Характеристика образца сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье (в %) в пересчете на рамноцитрин
1	Почки апикальные (г. Димитровград Ульяновской обл., апрель 2012 г.)	1,24±0,01
2	Почки апикальные (г. Самара, Ботанический сад, март 2013 г.)	2,31±0,03
3	Почки боковые (г. Самара, Ботанический сад, май 2013 г.)	1,43±0,01
4	Почки апикальные и латеральные (г. Пенза, апрель 2016 г.)	1,28±0,02
5	Почки апикальные и латеральные, г. Самара, Ботанический сад, март 2018 г.)	1,70±0,02

5.2.2. Количественное определение рамноцитрина в почках каштана конского обыкновенного методом ВЭЖХ

Для осуществления ВЭЖХ-анализа был осуществлен подбор системы растворителей (смесь ацетонитрил:вода в различных соотношениях с подкислением 1% уксусной кислотой). Выявлено, что в системе ацетонитрил:вода в соотношении 7:3 возможно идентифицировать рамноцитрин (рис. 40) и 7,4¹-диметилкемпферол (рис. 41), времена удерживания которых представлены в табл. 8. При этом наблюдается хорошее разделение веществ как в модельной смеси, так и в извлечении (рис. 42 и рис. 43).

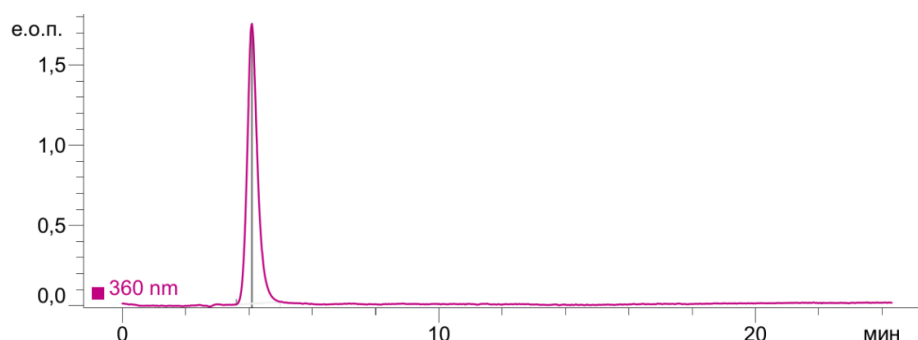


Рисунок 40 - Хроматограмма рамноцитрина (элюент: ацетонитрил-вода 7:3).

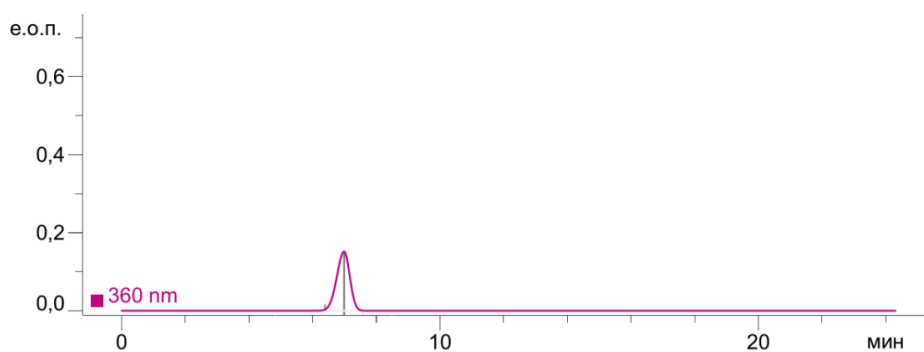


Рисунок 41 - Хроматограмма 7,4¹-диметилкемпферола (элюент: ацетонитрил-вода 7:3).

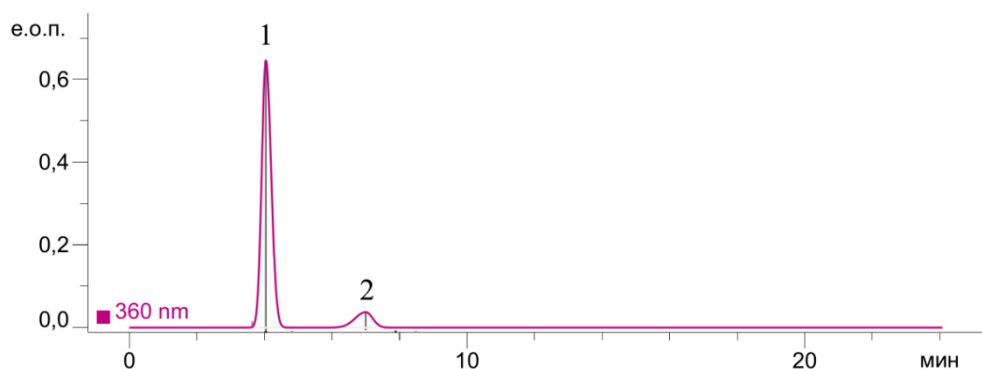


Рисунок 42 - Хроматограмма смеси рамноцитрина и 7,4¹-диметилкемпферола (элюент: ацетонитрил-вода 7:3).

Обозначения: 1 - рамноцитрин; 2 – 7,4¹-диметилкемпферол.

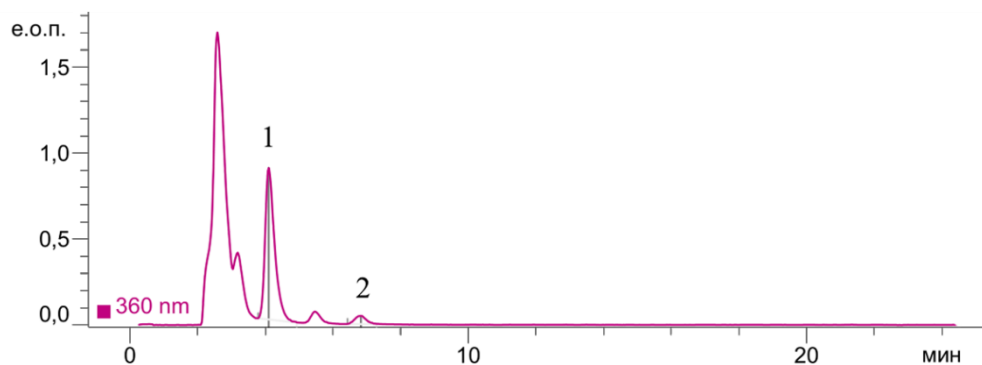


Рисунок 43 - Хроматограмма извлечения из почек каштана конского (элюент: ацетонитрил-вода 7:3).

Обозначения: 1 - рамноцитрин; 2 – 7,4¹-диметилкемпферол.

Однако в данных условиях хроматографирования с точки зрения количественного определения значения времени удерживания обоих компонентов нельзя считать оптимальными. Кроме того, принимая во

внимание невысокое содержание 7,4¹-диметилкемпферола в извлечении по сравнению с рамноцитрином, считаем целесообразным количественный анализ осуществлять только по рамноцитрину. В связи с этим нами было принято решение использовать для анализа систему растворителей ацетонитрил:вода в соотношении 5:5, что позволяет обеспечить, на наш взгляд, оптимальное разделение и время выхода (t_R) диагностически значимого флавоноида - рамноцитрина.

Определено, что в данной системе растворителей время удерживания для рамноцитрина в стандартном образце и в извлечении составляет 9,600 мин и 9,546 мин соответственно (рис. 44 и рис. 45). Добавление раствора рамноцитрина в извлечение проявляется на хроматограмме увеличением интенсивности пика рамноцитрина по сравнению с таковой рамноцитрина в исходном испытуемом растворе (рис. 46).

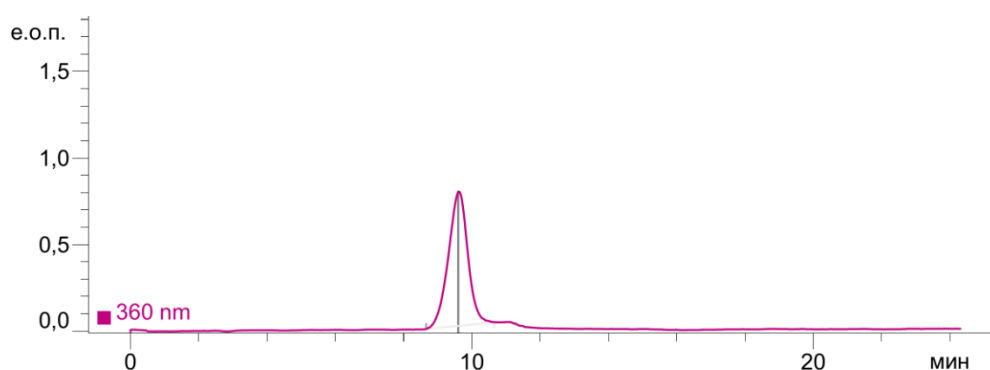


Рисунок 44 - Хроматограмма рамноцитрина (элюент: ацетонитрил-вода 5:5).

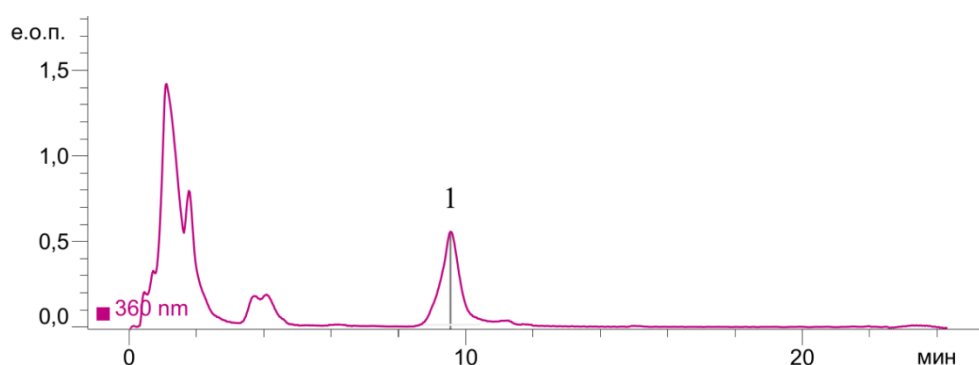


Рисунок 45 - Хроматограмма извлечения из почек каштана конского (элюент: ацетонитрил-вода 5:5).

Обозначения: 1 – рамноцитрин.

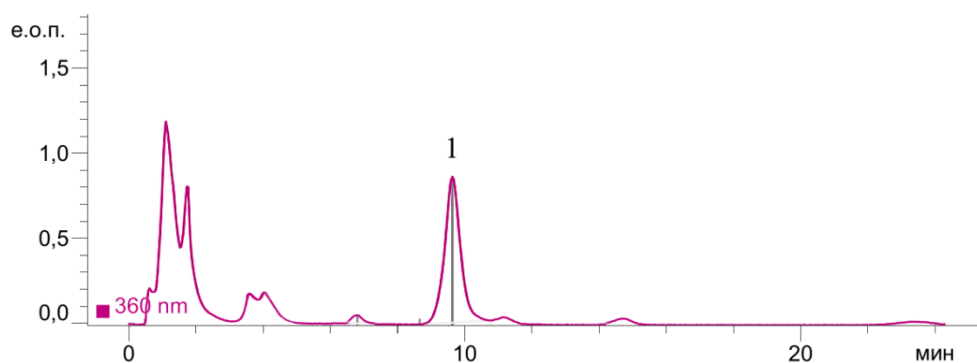


Рисунок 46 - Хроматограмма извлечения из почек каштана конского с добавлением рамноцитрина (элюент: ацетонитрил-вода 5:5).

Обозначения: 1 – рамноцитрин.

Таблица 8 - Времена удерживания пиков флавоноидов почек каштана конского обыкновенного

Флавоноид	Время удерживания на хроматограмме, мин			
	PCO	Извлечение	PCO	Извлечение
	система растворителей: ацетонитрил-вода 7:3		система растворителей: ацетонитрил-вода 5:5	
Рамноцитрин (7-О-метилкемпферол)	4,092	4,101	9,600	9,546
7,4 ¹ -диметилкемпферол	6,987	6,828	не определялось	не определялось

Методика количественного определения рамноцитрина в почках каштана конского обыкновенного.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

6 мкл полученного раствора вводят в жидкостной хроматограф «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором. Хроматографируют в условиях обращенно-фазовой хроматографии в изократическом режиме на стальной колонке производства «Элсико» (2 мм x 80 мм, неподвижная фаза - Kromasil C18 с размером частиц 5 мкм), элюентная система - ацетонитрил:вода в соотношении 5:5 с добавлением 1% уксусной кислоты, скорость элюирования - 100 мкл/мин., объем элюента - 2500 мкл, объем пробы - 2 мкл.

Проводят УФ-детектирование при длине волны 360 нм, диапазон чувствительности 0,5. Проводят не менее 3 параллельных определений.

Параллельно 2 мкл раствора РСО рамноцитрина вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Проводят определение площади пика РСО рамноцитрина и рассчитывают среднюю площадь пика по результатам 3-х определений.

Определяют время выхода и идентифицируют пик рамноцитрина на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площадь пика рамноцитрина на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по трем параллельным определениям.

Примечание: *Приготовление раствора рамноцитрина - рабочего стандартного образца.* Около 0,025 (точная навеска) рамноцитрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10-15 мл 96% этилового спирта при нагревании на водяной бане, после охлаждения содержимого колбы доводят объем раствора 96% этиловым спиртом до метки и перемешивают.

Содержание рамноцитрина в почках каштана конского обыкновенного в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times m_0 \times V \times V_2 \times 100 \times 100}{S_0 \times m \times V_0 \times V_1 \times (100 - W)},$$

где S – среднее значение площади пика рамноцитрина испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца;

S_0 - среднее значение площади пика раствора РСО рамноцитрина, вычисленное из хроматограмм раствора РСО рамноцитрина;

V - объем извлечения, мл;

V_1 - объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл;

V_0 – объем раствора РСО рамноцитрина, мл;

V_2 – объем вводимой пробы раствора РСО рамноцитрина, мкл;

m - масса сырья, г;

m_0 - масса РСО рамноцитрина, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, в процентах.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия: эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику рамноцитрина, должна быть не менее 3000 теоретических тарелок.

Метрологические характеристики методики количественного определения рамноцитрина в почках каштана конского обыкновенного представлены в табл. 9. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения рамноцитрина в почках каштана конского с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 5,88\%$ (табл. 9).

Таблица 9 - Метрологические характеристики методики количественного определения рамноцитрина в почках каштана конского обыкновенного

f	\bar{X}	S	$P, \%$	$t(P,f)$	ΔX	$E, \%$
10	0,33	0,0087	95	2,23	$\pm 0,007$	$\pm 5,88$

Испытания с добавками РСО рамноцитрина к навеске сырья показали, что ошибка анализа укладывается в пределы ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки разработанной методики (табл. 10).

Таблица 10 - Содержание рамноцитрина в почках каштана конского в зависимости от добавления рамноцитрина

Исходное содержание рамноцитрина, мг/г	Добавлено рамноцитрина, мг/г	Содержание рамноцитрина, мг/г		Ошибка	
		Расчетное	Найденное	Абс., мг	Относит., %
3,40	0,90	4,30	4,25	-0,05	-1,18
3,40	1,70	5,10	5,11	+0,01	+0,16
3,40	2,60	6,00	5,81	-0,19	-3,23

С использованием разработанной методики нами проанализированы образцы почек каштана конского (табл. 11) и при этом определено, что содержание рамноцитрина в данных образцах варьирует от $0,34 \pm 0,02\%$ до $0,45 \pm 0,03\%$.

Таблица 11 - Содержание рамноцитрина в образцах почек каштана конского обыкновенного

№ п/п	Характеристика образца сырья	Содержание рамноцитрина в абсолютно сухом сырье, %
1	Почки апикальные (г. Димитровград Ульяновской обл., апрель 2012 г.)	$0,34 \pm 0,02\%$
2	Почки апикальные и латеральные (г. Пенза, апрель 2016 г.)	$0,35 \pm 0,02\%$
3	Почки апикальные и латеральные, г. Самара, Ботанический сад, март 2018 г.)	$0,39 \pm 0,02$
4	Почки апикальные и латеральные, г. Самара, Ботанический сад, апрель 2019 г.)	$0,45 \pm 0,02\%$

5.3. Определение числовых показателей для нового вида лекарственного растительного сырья «Каштана конского обыкновенного почки»

В ходе разработки проекта нормативной документации на новый вид ЛРС необходимо определение числовых показателей для данного сырья [17, 18, 19, 35].

В соответствии с ГФ РФ XIV для сырья почек каштана конского производилось определение содержания действующих веществ, влажности, содержания золы общей и золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, измельченности и содержания примесей [17].

Полученные результаты отражены в табл. 12.

Таблица 12 – Результаты определения числовых показателей сырья почек каштана конского обыкновенного

Показатель	Значение для цельного сырья
Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рамноцитрин	От 1,24% до 2,31%
Содержание рамноцитрина	От 0,34% до 0,45%
Экстрактивные вещества	От 10,05% до 14,12%
Влажность	От 5,85% до 7,95%
Зола общая	От 7% до 10%
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	От 0,5 до 1%
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм	От 3 до 5%
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм	-
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,5 мм	-
Веточки, в т.ч. отделенные при анализе	Не более 10%
Почки, тронувшиеся в рост и распустившиеся	Не более 2%
Органическая примесь	Не более 1%
Минеральные примеси	Не более 0,5%

Таким образом, для почек каштана конского обыкновенного определены следующие числовые показатели:

Для цельного сырья: содержание суммы флавоноидов в пересчете на рамноцитрин не менее 1,0%; содержание рамноцитрина не менее 0,34%; экстрактивных веществ не менее 14%; влажность не более 8%, золы общей не более 10%; золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты не более 1%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, не более 5%; веточек не более 10%; почек, тронувшихся в рост и распутившихся, не более 2%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 0,5%.

Результаты включены в проект ФС на новый вид лекарственного растительного сырья «Каштана конского обыкновенного почки».

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Разработана методика качественного анализа почек каштана конского обыкновенного методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей хлороформ:этанол 19:1 с использованием стандартного образца лютеолина.
2. Спектр поглощения водно-спиртового извлечения из почек имеет максимумы при длинах волн 280 ± 2 нм, 340 ± 2 нм, 420 ± 2 нм, характерные для флавоноидов. Флавоноидная природа компонентов извлечения также подтверждается батохромным сдвигом кривой поглощения при добавлении спиртового раствора алюминия (III) хлорида.
3. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 422 нм. Содержание суммы флавоноидов варьировало от $1,24\pm 0,01\%$ до $2,31\pm 0,03\%$, что дает основания рекомендовать в качестве нижнего предела содержания суммы флавоноидов в почках каштана конского значение не менее 1,0%. Ошибка единичного определения метода с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 2,23\%$.
4. Разработана методика количественного определения рамноцитрина в почках каштана конского обыкновенного методом ВЭЖХ. Содержание рамноцитрина в почках варьировало от $0,34\pm 0,02\%$ до $0,45\pm 0,02\%$, что дает основания рекомендовать в качестве нижнего предела содержания рамноцитрина в почках каштана конского значение не менее 0,3%. Ошибка единичного определения метода с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 5,88\%$.
5. Предложенные методики качественного и количественного анализа и числовые показатели для почек каштана конского обыкновенного включены в проект ФС на новый вид ЛРС – «Каштана конского обыкновенного почки».

ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО

В соответствии с результатами исследования химического состава почек каштана конского, а также литературными данными о химическом составе цветков каштана [48] есть основания предполагать различные виды фармакологической активности для данных объектов, в частности, противомикробного и диуретического действия. В связи с этим проводилось определение антимикробной и противогрибковой активности водно-спиртовых извлечений из цветков и почек каштана конского и раствора рамноцитрина в 70% этаноле. Кроме того, в рамках диссертационной работы был получен лекарственный растительный препарат – настойка почек каштана конского (1:5) на 70% спирте, являющимся наиболее оптимальным экстрагентом для почек каштана. Для полученного препарата изучалось влияние на выделительную функцию почек и определялась острая токсичность в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 [14].

6.1. Определение антимикробной и противогрибковой активности водно-спиртовых извлечений из почек и цветков каштана конского обыкновенного

По результатам скринингового анализа антимикробной активности было установлено, что извлечение из почек каштана на 40% этаноле оказывает действие в отношении *Pseudomonas aeruginosa* при разведении в 2, 4, 8, 16 и 32 раза, *Escherichia coli* при разведении в 2, 4, 8 раз и *Bacillus cereus* при разведении в 2 раза. При дальнейшем разведении извлечения наблюдался рост тестируемых микроорганизмов. В отношении *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* извлечение из почек каштана на 40% этаноле неактивно (табл. 13).

Извлечение из почек на 96% этаноле проявило антибактериальную активность в отношении золотистого стафилококка, но при этом отмечено отсутствие действия на *Bacillus cereus*. Так, установлено, что извлечение активно в отношении *Pseudomonas aeruginosa* при разведении в 2, 4, 8, 16 и 32 раза, *Staphylococcus aureus* – при разведении в 2, 4 и 8 раз и *Candida albicans* – при разведении в 2 и 4 раза. При дальнейшем разведении наблюдался рост тестируемых микроорганизмов (табл. 15).

Таблица 15 - Антимикробная активность водно-спиртового (96% этиловый спирт) извлечения из почек каштана конского обыкновенного (1:50)

Штамм микроорганизма	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Staphylococcus aureus</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Escherichia coli</i>	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Bacillus cereus</i>	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Candida albicans</i>	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост

По результатам анализа извлечение из цветков на 40% этаноле установлено антибактериальное действие в отношении всех штаммов микроорганизмов. В частности, извлечение активно в отношении *Pseudomonas aeruginosa* при разведении в 2, 4, 8, 16 и 32 раза, *Staphylococcus aureus* – при разведении в 2, 4 и 8 раз, *Escherichia coli* – при разведении в 2, 4, 8, 16 раз, *Bacillus cereus* и *Candida albicans* – при разведении в 2 и 4 раза (табл. 16).

Максимальная широта антимикробного действия показана для извлечения из цветков на 96% этаноле. Так, извлечение активно в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Candida albicans* при разведении в 2, 4, 8, 16 и 32 раза, *Staphylococcus aureus* – при разведении в 2, 4, 8 и 16 раз, *Bacillus cereus* – при разведении в 2, 4 и 8 раз (табл. 18).

Таблица 18 - Антимикробная активность водно-спиртового (96% этиловый спирт) извлечения из цветков каштана конского обыкновенного (1:50)

Штамм микроорганизма	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Staphylococcus aureus</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Escherichia coli</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Bacillus cereus</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Candida albicans</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост

Анализ спиртового раствора рамноцитрина показал выраженное угнетающее действие на рост *Candida albicans* при разведении в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 и 256 раз). Антимикробное действие в отношении *Pseudomonas aeruginosa* наблюдается при разведении в 2, 4, 8, 16 и 32 раза, *Escherichia coli* - при разведении в 2, 4, 8, 16 раз, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus* – при разведении в 2 и 4 раза (табл. 19).

Таблица 19 - Антимикробная активность рамноцитрина

Штамм микроорганизма	Порядковый номер разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Staphylococcus aureus</i>	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Escherichia coli</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Bacillus cereus</i>	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Candida albicans</i>	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рост	Рост	Рост	Рост

В сравнительном аспекте наиболее широким антимикробным действием обладают извлечения из цветков каштана конского обыкновенного; максимальную активность в данном случае проявляет извлечение из цветков на 96% этиловом спирте. Извлечения из почек обладают меньшим спектром активности, так, извлечение на 40% этаноле неактивно в отношении *Staphylococcus aureus*, извлечение на 96% спирте не проявляет действия в отношении *Bacillus cereus*. Рамноцитрин имеет выраженное противогрибковое действие в отношении *Candida albicans*, но при этом практически неактивен в отношении остальных штаммов микроорганизмов.

6.2. Определение антимикробной активности извлечений из почек и цветков каштана конского обыкновенного в отношении штаммов, сопутствующих муковисцидозу

Извлечение из почек каштана конского обыкновенного на 96% этиловом спирте оказывает антимикробное действие в отношении *Burkholderia cepacia* ST 208 и *Pseudomonas aeruginosa*. Бактерицидное действие наблюдается в отношении *Burkholderia cepacia* ST 208 до разведения 1:16, бактериостатическое до разведения 1:64. Бактерицидный эффект в отношении *Pseudomonas aeruginosa* выявлен в разведениях до 1:8, бактериостатический –

в разведениях до 1:16.

В отношении *Burkholderia multivorans* данный объект неактивен (табл. 20).

Таблица 20 - Антимикробная активность водно-спиртового (96% этиловый спирт) извлечения из почек каштана конского обыкновенного (1:50)

Штамм	Разведение											
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
<i>Burkholderia ceposepacia</i> ST 208 Штамм 105	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Задержка роста	Задержка роста	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Burkholderia ceposepacia</i> ST 208 Штамм 136	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Задержка роста	Задержка роста	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Burkholderia multivorans</i> Штамм 141	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Burkholderia multivorans</i> Штамм 139	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Штамм 799	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Задержка роста	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост

Извлечение из почек на 70% этиловом спирте показало более выраженную антимикробную активность в отношении штаммов *Burkholderia ceposepacia* ST 208 (до разведения 1:128) и *Pseudomonas aeruginosa* (до разведения 1:32). Также наблюдалось бактерицидное (в разведениях до 1:8) и бактериостатическое (в разведениях до 1:16) действие в отношении штамма 139 *Burkholderia multivorans* (табл. 21).

Активность в отношении *Burkholderia cenocepacia* ST 208 и *Pseudomonas aeruginosa* имеет спиртовой (70% этанол) раствор рамноцитрина. Стоит отметить менее выраженное бактерицидное действие, а также заметное снижение активности по отношению к *Burkholderia multivorans* (табл. 26).

Таблица 26 - Антимикробная активность рамноцитрина

Штамм	Разведение											
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
<i>Burkholderia cenocepacia</i> ST 208 Штамм 105	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Задержка роста	Задержка роста	Задержка роста	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Burkholderia cenocepacia</i> ST 208 Штамм 136	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Задержка роста	Задержка роста	Задержка роста	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Burkholderia multivorans</i> Штамм 141	Роста нет	Роста нет	Задержка роста	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Burkholderia multivorans</i> Штамм 139	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Задержка роста	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Штамм 799	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Задержка роста	Задержка роста	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост	Рост

Таким образом, было выявлено, что наиболее широким антимикробным действием обладают извлечения из цветков каштана конского обыкновенного; максимальную активность, особенно по отношению к *Burkholderia cenocepacia* ST 208, в данном случае проявляет извлечение из цветков на 96% этиловом спирте. Извлечения из почек во всех случаях эффективны в отношении *Burkholderia cenocepacia* ST 208 и *Pseudomonas aeruginosa* и малоактивны в отношении *Burkholderia multivorans*, причем активность в данном случае обратно пропорциональна концентрации растворителя. Рамноцитрин имеет схожий с извлечениями из почек профиль антимикробного действия и незначительно уступает по активности извлечениям из цветков.

6.3. Определение влияния настойки почек каштана конского обыкновенного на выделительную функцию почек

Результаты исследования показали, что при однократном внутрижелудочном введении настойки почек каштана в дозе 100 мг/кг в течение 4-х часового эксперимента в опытной группе животных не отмечалось достоверного увеличения определяемых показателей (диурез, натрийурез, калийурез и креатининурез) относительно контрольной группы, получавшей водно-спиртовую нагрузку. Следовательно, настойка каштана конского не оказывает влияния на выделительную функцию почек.

6.4. Определение острой токсичности настойки почек каштана конского обыкновенного

В ходе определения острой токсичности не было зафиксировано летальных случаев, не наблюдалось нарушений в поведенческой активности обеих подопытных групп крыс.

Анализируя данные по изучению острой токсичности полученной настойки, можно сделать вывод о безопасности применения данного препарата и отнести его к III классу токсичности в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 [14].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Определена антимикробная и противогрибковая активность извлечений из почек и цветков каштана конского, а также индивидуального вещества – рамноцитрина. Выявлено:
 - наиболее широким антимикробным действием обладают извлечения из цветков каштана конского обыкновенного на 96% этиловом спирте;
 - извлечения из почек обладают более узким спектром действия по сравнению с извлечением из цветков, но более выраженной активностью. Наиболее показательны результаты изучения извлечения из почек на 70% спирте;
 - рамноцитрин имеет выраженное противогрибковое действие в отношении *Candida albicans*, в отношении остальных штаммов микроорганизмов наблюдается умеренное угнетающее действие.
2. Определена антимикробная и противогрибковая активность извлечений из почек и цветков каштана конского в отношении специфичных штаммов микроорганизмов, полученных от пациентов с муковисцидозом:
 - наиболее широким антимикробным действием обладают извлечения из цветков каштана конского обыкновенного, максимальную активность имеет извлечение на 96% этиловом спирте;
 - извлечения из почек во всех случаях эффективны в отношении *Burkholderia cenocepacia* ST 208 и *Pseudomonas aeruginosa* и малоактивны в отношении *Burkholderia multivorans*;
 - рамноцитрин имеет схожий с извлечениями из почек профиль антимикробного действия и незначительно уступает по активности извлечениям из цветков.
3. Целесообразно использование в качестве противомикробного средства извлечений из почек каштана конского на 70% этиловом спирте,

являющимся оптимальным экстрагентом для данного объекта, наиболее полно извлекающим активные компоненты.

4. Изучение острой токсичности настойки почек каштана конского, приготовленной на 70% этиловом спирте, показало ее безопасность. Препарат отнесен к III классу токсичности (ГОСТ 12.1.007-76) [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) были сделаны следующие общие выводы:

1. В результате анатомо-морфологического исследования почек каштана впервые выявлены диагностически значимые признаки, заключающиеся в особенностях почкосложения, листосложения и расположения зачатков листьев и соцветий, характере взаимного расположения сосудистых пучков, наличии и форме трихом и железок на поверхностях чешуй почки, а также особенностях люминесценции клеток и тканей почки при облучении УФ светом с $\lambda=360$ нм и $\lambda=420$ нм.
2. С использованием метода люминесцентной микроскопии были уточнены и дополнены уже известные характерные особенности строения семян каштана конского. Выявлены характерные особенности люминесценции при облучении УФ светом с $\lambda=360$ нм и $\lambda=420$ нм сосудов ксилемы, клеток флоэмной ткани, клеток эпидермы и паренхимы семенной кожуры.
3. Впервые определены особенности петиолярной анатомии листьев каштана конского, заключающиеся в характеристиках очертаний поперечных сечений черешка листа, пигментации клеток сердцевинки и наличии центральной группы пучков, особенностях строения паренхимы коровой части; выявлены особенности люминесценции кутикулы эпидермы, пигментов в клетках флоэмы и ксилемы, клеток склеренхимы и клеток сердцевинки.
4. Сравнительное фитохимическое исследование коры, цветков, почек, семян, экзокарпия плодов каштана конского позволило выявить наличие в данных видах сырья веществ фенольной природы, в частности, флавоноидов. Показана перспективность изучения флавоноидного состава почек каштана конского, из которых впервые для данного вида сырья выделены с использованием колоночной хроматографии и идентифицированы с применением методов ТСХ, УФ-спектрофотометрии, ЯМР-спектроскопии

и масс-спектрометрии вещества флавоноидной природы – рамноцитрин (7-О-метилкемпферол) и 7,4'-диметилкемпферол.

5. Разработана методика качественного анализа почек каштана конского обыкновенного методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей хлороформ:этанол 19:1 с использованием стандартного образца рамноцитрина, являющегося диагностически значимым (величина R_f для рамноцитрина составляет 0,7). Кроме того, для оценки подлинности почек каштана конского обыкновенного обосновано использование УФ-спектрофотометрии путем определения максимумов кривой поглощения спирто-водного извлечения из почек каштана конского обыкновенного (максимумы при длинах волн 280 ± 2 нм, 340 ± 2 нм, 420 ± 2 нм). Флавоноидная природа компонентов извлечения также подтверждается батохромным сдвигом кривой поглощения при добавлении спиртового раствора алюминия (III) хлорида.
6. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 422 нм. Содержание суммы флавоноидов варьировало от $1,24\pm 0,01\%$ до $2,31\pm 0,03\%$, что дает основания рекомендовать в качестве нижнего предела содержания суммы флавоноидов в почках каштана конского обыкновенного значение не менее 1,0%. Ошибка единичного определения метода с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 2,23\%$.
7. Разработана методика количественного определения рамноцитрина в почках каштана конского обыкновенного методом ВЭЖХ. Содержание рамноцитрина в почках варьировало от $0,34\pm 0,02\%$ до $0,45\pm 0,02\%$, что дает основания рекомендовать в качестве нижнего предела содержания рамноцитрина в почках каштана конского обыкновенного значение не менее 0,3%. Ошибка единичного определения метода с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 5,88\%$.

8. Определена антимикробная и противогрибковая активность извлечений из почек каштана конского, а также индивидуального вещества – рамноцитрина. Выявлено, что извлечение из почек каштана конского на 70% спирте проявляет угнетающее рост действие в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*. Спиртовой раствор рамноцитрина обладает выраженным противогрибковым действием в отношении *Candida albicans*, что позволяет позиционировать это вещество как основу для создания противогрибковых лекарственных средств.
9. Изучение острой токсичности настойки почек каштана конского, приготовленной на 70% этиловом спирте, показало ее безопасность. Препарат отнесен к III классу токсичности (ГОСТ 12.1.007-76).
10. На основе результатов исследований морфолого-анатомических признаков, химического состава, определения числовых показателей сырья разработан проект ФС на новый вид ЛРС «Каштана конского обыкновенного почки».

Практические рекомендации. Результаты диссертационной работы будут способствовать совершенствованию подходов к стандартизации ЛРС, содержащего флавоноиды, и могут быть использованы в учебном процессе по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также в организациях и предприятиях, специализирующихся в области создания, стандартизации, сертификации и контроля качества лекарственных средств.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Проведение диссертационного исследования имеет научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии с целью дальнейшего изучения химического состава растений, содержащих флавоноиды, а также разработки методик анализа и стандартизации лекарственного растительного сырья, которые отвечают современным требованиям. Кроме того, важное значение имеет научное обоснование комплексного использования растительных

ресурсов в медицинской и фармацевтической практике. В процессе исследований большое значение придается использованию современных методов анализа и инструментальной базы, а также изучению фармакологического действия лекарственного растительного сырья и растительных ЛС.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

БАС – биологически активные соединения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГСО – государственный стандартный образец

ГФ – Государственная Фармакопея

ДСК – диазобензолсульфокислота

ЛРП – лекарственный растительный препарат

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ОФС – общая фармакопейная статья

РСО – рабочий стандартный образец

РФ – Российская Федерация

СО – стандартный образец

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр

ФС – фармакопейная статья

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анавенол - официальная инструкция по применению, аналоги [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://medi.ru/instrukciya/anavenol_3262 (дата обращения 09.07.2018).
2. Анавенол [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.zdravzona.ru/product/anavenol-tab-60> (дата обращения 09.07.2018).
3. Ангионорм – официальная инструкция по применению, аналоги [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://medi.ru/instrukciya/angionorm_550 (дата обращения 09.07.2018).
4. Беликов, В.В. Применение ВЭЖХ в анализе флавоноидных препаратов / В.В. Беликов // Проблемы стандартизации и контроля качества лекарственных средств: Мат. докл. всесоюз. конф., 18-21 декабря 1991. – М., 1991. – Т. 2, ч. 1 – С. 14-16.
5. Богачев, В.Ю. Системная фармакотерапия хронической венозной недостаточности нижних конечностей. Современное состояние вопроса / Ю.В. Богачев // Русский медицинский журнал. - 2004. - №17. – С. 3-6.
6. Большая Советская энциклопедия / Гл. редактор А.М. Прохоров. – 3-е издание. – М.: Советская энциклопедия, 1973. - т.13. - 446 с.
7. Вандышев, В.В. Старинное лекарственное растение – конский каштан обыкновенный – источник современных эффективных лекарственных средств / В.В. Вандышев // Медицинская помощь. – 2002. - №5. – С. 36-38.
8. Веноплант – официальная инструкция по применению, [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://medi.ru/instrukciya/venoplant_5469 (дата обращения 09.07.2018).
9. Веноплант. Инструкция к препарату [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.schwabe.ru/index.php?eid=3> (дата обращения 05.06.2017).

10. Гаврилов, А.С. Фармацевтическая технология. Изготовление лекарственных препаратов / А.С. Гаврилов. – М.: Гэотар-Медиа, 2010. – 624 с.
11. Гаммерман, А.Ф., Кадаев, В.Н. Лекарственные растения (Растения-целители) / А.Ф. Гаммерман, В.Н. Кадаев. — М.: Высшая школа, 1983.— 400 с.
12. Глембовская, О.Т. Структурирование рынка ЛС по возрастному критерию потребителей / О.Т. Глембовская, О.И. Чернова // Московские аптеки. - 2002. - №11 — С. 21-26.
13. Горовой, П.Г. Таксономическое значение анатомического строения черешков листьев в роде *Megadenia Maxim (Cruciferae)* / П.Г. Горовой, Е.В. Болтенков, О.В. Яковлева, Р.В. Дудкин // Доклады Академии наук. – 2011. – Т. 439. – № 1. – С. 129-131.
14. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.
15. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание / МЗ РФ. – Москва, 2015. – Том 2. – С. 280 - 289.
16. Государственная Фармакопея КНР (на китайском языке). - Пекин, 2005.-Т. 1.- 668 с.
17. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т.1 / Москва, 2018. – 1814 с. [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_1/HTML/index.html (дата обращения 15.01.2019).
18. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т.2 / Москва, 2018. – 1448 с. [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/index.html (дата обращения 15.01.2019).
19. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Т.4 / Москва, 2018. – 1832 с. [Электронный ресурс] // Режим доступа:

- http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_4/HTML/index.html (дата обращения 15.01.2019).
20. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru> (дата обращения 04.12.2019).
 21. Гринкевич, Н.И. Лекарственные растения. Справочное пособие / Н.И. Гринкевич. - М.: Высшая школа, 1991. – 142 с.
 22. Губанов, И.А., Крылова, И.Л., Тихонова, В.Л. Дикорастущие полезные растения СССР / Под ред. Т.А. Работнова. – М.: Мысль, 1976. – 360 с.
 23. Дзюба, А.С. Российский рынок суппозиторий: оценка основных тенденций / А.С. Дзюба // Ремедиум. - 2013. - №9. - С. 44-48.
 24. Жарова, О.Г. Морфолого-анатомическое изучение семян конского каштана обыкновенного / О.Г. Жарова, Т.А. Сокольская, В.В. Вандышев // Фармация. - 2009. - № 1.
 25. Жарова, О.Г. Стандартизация конского каштана обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) семян и экстракта сухого на их основе: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук: 15.00.02 / Жарова Олеся Глебовна. – М., 2009. – 27 с.
 26. Жидкостная колоночная хроматография / Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака (пер. с англ.). – М.: Мир. – 1978. – 428 с.
 27. Жизнь растений. В шести томах. / Под редакцией ак. АН СССР А.Л. Тахтаджяна. – М.: Просвещение, 1981. - Т.5, ч.2. - 547с.
 28. Жукович, Е.Н. Стандартизация густого экстракта каштана конского / Е.Н. Жукович, Л.А. Шарикова, Т.Ф. Прибыткова, С.Ю. Бокарева // Фармация. – 2005. - №2. – С. 12-14.
 29. Задорожный, А.М. Справочник по лекарственным растениям / А.М. Задорожный, А.Г. Кошкин, С.Я. Соколов и др. – М.: Лесн. пром-сть, 1988. – 415 с.
 30. Здравоохранение в цифрах [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.rosminzdrav.ru/open/usefull/stat> (дата обращения 14.02.2017).

31. Зурабян, С.Э. Номенклатура природных соединений: Справочное пособие / С.Э. Зурабян - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 204 с.
32. Каталог то[бваров: АнгиНорм [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.eapteka.ru/goods/id286951> (дата обращения 09.07.2018).
33. Каштан конский обыкновенный [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://ou62.omsk.obr55.ru/files/Растения/rast/к/kahtan.htm> (дата обращения 09.07.2018).
34. Керимов, Ю.Б. Получение и изучение эсцина из околоплодника *Aesculus hippocastanum* L. / Ю.Б. Керимов, Д.И. Исаев, А.И. Деркач // Фармаком. - 2005. - № 1. -С. 71-74.
35. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова. – М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – 295 с.
36. Кияшко, В.А. Консервативное лечение хронической венозной недостаточности / В.А. Кияшко // Русский медицинский журнал. - 2002. - № 26. – С.14-19.
37. Козлова, А.С. Рынок венотонизирующих препаратов / А.С. Козлова // Ремедиум. - 2011. - №4. - С.16-17.
38. Кононенко, Г.П. Флавоноидные агликоны почек березы бородавчатой (*Betula verrucosa*) / Г.П. Кононенко, С.А. Поправко, И.С. Вульфсон // Биоорганическая химия. 1975. Т. 1. №4. С. 506-511.
39. Конский каштан обыкновенный [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.ecosystema.ru/08nature/trees/38.htm> (дата обращения 06.06.2018).
40. Конский каштан. Horse chestnut. Род *Aesculus* // Дерево.RU. Деловой журнал по деревообработке. — 2008. — № 4. — С. 34—38.
41. Конского каштана экстракт жидкий (Horse Chestnut extract fluid) - инструкция по применению, состав, аналоги препарата, дозировки,

- побочные действия [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_44202.htm (дата обращения 09.07.2018).
42. Корнюшин, В.И. Препараты для лечения геморроя и других проктологических заболеваний / В.И. Корнюшин // Лекарственный справочник. - 2014. - 24 февраля.
43. Краснюк, И.И. Фармацевтическая технология. Технология лекарственных форм / И. И. Краснюк, Г. В. Михайлова, Е.Т. Чижова. — М.: Академия, 2004. — 464 с.
44. Куркин, В.А. Актуальные аспекты создания импортозамещающих лекарственных растительных препаратов / В.А. Куркин, И.К. Петрухина // Фундаментальные исследования. – 2014. – №11. – С. 366-371.
45. Куркин, В.А., Петиолярная анатомия в рамках анатомо-морфологического исследования перспективного лекарственного сырья – травы женьшеня / В.А. Куркин, А.С. Акушская, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко, П.Д. Топоркова // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 5-6. – С. 1274-1278.
46. Куркин, В.А. Сравнительное исследование диуретической активности водно-спиртовых извлечений лекарственных растений, содержащих флавоноиды / В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, А.В. Куркина, А.В. Дубищев, О.Е. Правдивцева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 159, № 3. – С. 348-352.
47. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов). – 3-е изд., перераб. и доп. / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2016. – 1279 с.
48. Куцик, Р.В. Каштан конский (*Aesculus hippocastanum* L.). Аналитический обзор / Р.В. Куцик, Б.М. Зузук, В.В. Дьячок // Провизор. - 2002. - № 4. – С. 12-18.
49. Кьосев, П.А. Полный справочник лекарственных растений. / П.А. Кьосев. – М.: Эксмо, 2006. - 944 с.

50. Лапина, А.С. Новые аспекты в морфолого-анатомической диагностике травы монарды дудчатой (*Monarda fistulosa* L.) / А.С. Лапина, В.А. Куркин, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко // Аспирантский вестник Поволжья. - 2019. - № 1-2. - С. 19-26.
51. Лекарственная продукция из натуральных растений [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.lektrava.ru> (дата обращения: 26.02.2018).
52. Лотова, Л.И. Ботаника: Морфология и анатомия высших растений: учебник. – 4-е изд. доп. / Л.И. Лотова.– М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2010. – 512 с.
53. Малоштан, Л.Н. Доклиническое исследование специфической активности настойки листьев каштана конского / Л.Н. Малоштан, А.А. Башура, Н.П. Половко // Клінічна фармація. – 2011. – Т. 15. – № 4. – С. 57-59.
54. Малоштан, Л.М. Дослідження активності настойки листа каштана кінського з метою розробки складу лікарських і косметичних засобів / Л.Н. Малоштан, А.А. Башура, Н.П. Половко, О. Струс // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2012. – № 1 (8). – С. 71-73.
55. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 10-е издание / П.Ф. Маевский. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 600 с.
56. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. / М.Д. Машковский. – Изд. 14-е, перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2002. – 2 т.
57. Недоговорова, К.В. Противогеморроидальные и венотонизирующие лекарственные препараты. Мониторинг аптечных продаж / К.В. Недоговорова // Новая аптека. Эффективное управление. - 2009. - №10. - С. 12-13.
58. Обзор российского рынка лекарственных трав и сборов [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.marketcenter.ru/content/doc-2-10792.html> (дата обращения 10.11.2017).

59. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04 // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2004. - Т.6, № 4. – С. 306-359.
60. Отчет по безопасности применения лекарственного средства «Конского каштана экстракт жидкий», производства ООО «Камелия НПП» [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://kamelia.ru/publ/vracham/otchet_po_bezopasnosti_primenenija_lekarstvennogo_sredstva_konskogo_kashtana_ekstrakt_zhidkij_proizvodstva_ooo_kamelija_npp/1-1-0-3 (дата обращения 09.07.2018).
61. Паутова, Е.С. Фармацевтический рынок России. Аналитический обзор [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://medi.az/index.article&id=1081:2011-05-09-14-48-31&catid=28&Itemid=100119> (дата обращения 25.10.2017).
62. Половко, Н. П. Розробка складу і технології таблетованої форми з листя каштану кінського / Н.П. Половко , О.Г. Башура, І. Г. Пересадько // Вісн. фармації. - 2005. - № 3. - С. 9-12.
63. Постоюк, Н.А. Методика количественного определения суммы флавоноидов в листе каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) / Н.А. Постоюк, А.А. Маркарян, Т.А. Сокольская, Т.Д. Даргаева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2012. - №1. – С. 135-138.
64. Постоюк, Н.А. Анатомио-диагностические признаки листьев каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) / Н.А. Постоюк, А.А. Маркарян, М.А. Джавахян, Т.А. Сокольская, Т.Д. Даргаева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2012. - №2. – С. 19-22.

65. Постоюк, Н.А. Изучение стадии экстрагирования при получении сухого экстракта каштана конского / Н.А. Постоюк, А.А. Маркарян, Т.А. Сокольская, Т.Д. Даргаева // Фармация. - 2012. - №4. – С. 32-33.
66. Постоюк, Н.А. Фармакогностическое изучение и стандартизация каштана конского обыкновенного листьев (*Aesculus hippocastanum* L.) и экстракта сухого на его основе: автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук: 15.00.02 / Постоюк Наталья Александровна. – М., 2013. – 24 с.
67. При каких состояниях принимают эскузан [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://vetinpharm.com/venotonoki/pri-kakih-sostoyaniyah-prinimayut-eskuzan.html> (дата обращения 05.06.2018).
68. Раскин, И.М. Рациональная терапия хронической венозной недостаточности / И.М. Раскин, Я.С. Циммерман // Казанский медицинский журнал. – 1982. – №1. – С. 58–61.
69. РектАктив – инструкция [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://rectactiv.com/instruktsiya> (дата обращения 09.07.2018).
70. РЕПАРИЛ-ГЕЛЬ N (REPARIL-GEL N) инструкция по применению [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://www.vidal.ru/drugs/reparil-gel_n__15780 (дата обращения 09.07.2018).
71. Репарил-гель N. Инструкция по применению [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.smed.ru/pharmacy/reparil-gel-n-gel-tuba-40-g-madaus> (дата обращения 05.06.2018).
72. Самбукова, Т.В. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии / Т.В. Самбукова, Б.В. Овчинникова, В.П. Ганапольский, А.Н. Ятманов, П.Д. Шабанов // Фитофармакология. - 2017. - Т. 15. - № 2. - С. 56–63.
73. Самылина, И.А. Пути использования лекарственного растительного сырья и его стандартизация / И.А. Самылина, И.А. Баландина // Фармация. – 2004. – № 2. – С. 39-41.

74. Сдобнина, А.И. Диагностические признаки лекарственных растений в петиолярной анатомии. Биоразнообразии: проблемы и перспективы сохранения / А.И. Сдобнина // в сб. материалов Международной научной конференции, посвященной 135-летию со дня рождения И.И. Спрыгина. - Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского, 2008. – 420 с.
75. Соколова, Е.А. Значение признаков анатомического строения черешка для систематики родов *Cerasus* Mill. и *Padus* Mill. (*Rosaceae*) / Е.А. Соколова // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 1989. – Т. 124. – С. 109-112.
76. Синяков, А.Ф. Рецепты народной медицины / А.Ф. Синяков. - М.: Физкультура и спорт, 1994.- 447 с.
77. Справочник Видаль «Лекарственные препараты в России» [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.vidal.ru> (дата обращения 26.12.2018).
78. Справочник народной медицины [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.prodenas.ru/go.php?name=nm&nam=index-948> (дата обращения 16.01.2019).
79. ТУ 9377-075-04868244-2008. Семена конского каштана обыкновенного.
80. Ужегов, Г.Н. Энциклопедия народной медицины / Г.Н. Ужегов. - М.: Вече, 1999. - 592 с.
81. Федеральная служба государственной статистики (Росстат) [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.gks.ru> (дата обращения 14.02.2018).
82. Федосеева, Г.М. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды / Г.М. Федосеева, В.М. Минович, Е.Г. Горячкина, М.В. Переломова. – Иркутск, 2009. – 67 с.
83. Флора СССР / Комаров В. Л., Бобров Е. Г. и др. – Т. XIV, Москва-Ленинград: Издательство Академии Наук СССР, 1936. - с. 623.
84. Шарова, О.В. Фитохимическое исследование по стандартизации и созданию лекарственных средств на основе календулы лекарственной:

- авторeref. ... канд. фарм. наук: 15.00.02 / Шарова Ольга Владимировна. – Самара, 2007. – 44 с.
85. Шемерянкина, Т.Б. Совершенствование методов контроля и критериев стандартизации качества семян и сухого очищенного экстракта из семян конского каштана обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) / Т.Б. Шемерянкина, О.Г. Жарова, Т.А. Сокольская, Т.Д. Даргаева, Н.А. Постоюк // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2012. - №3. – С. 3-11.
86. Эксклюзивные растения для сада. Каштан конский обыкновенный [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://barvinoklend.ru/kashtan> (дата обращения 14.05.2017).
87. Эскузан :: Инструкция :: Цена :: Описание препарата [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.piluli.kharkov.ua/drugs/drug/1489> - 09.07.2018.
88. Эсфлазид :: Инструкция :: Цена :: Описание препарата [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.piluli.kharkov.ua/drugs/drug/542> (дата обращения 09.07.2018).
89. Albalawi, M.A.D. Isolation of Rhamnocitrin insecticide from *Retama raetam* via Sephadex LH-20 / M.A.D. Albalawi // IOSR Journal of Applied Chemistry. 2016. - Vol. 9. - P. 70-74.
90. British Herbal Pharmacopoeia [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.escop.com/bhma/bhma/publications.htm> (дата обращения 25.02.2019).
91. Celep, A.G.S. Antioxidant capacity and cytotoxicity of *Aesculus hippocastanum* on breast cancer MCF-7 cells / A.G.S. Celep, S. Yilmaz, N. Coruh // Journal of Food and Drug Analysis. - September 2012. - Vol. 20, No. 3. - P.692 – 698,717.
92. Chand, M. The management of haemorrhoids. / M. Chand, G.F. Nash, N. Dabbas // Br. J. Hosp. Med. (Lond). - 2008. - Vol. 69(1). - P. 35–40.
93. Deutsches Arzneibuch 10 (DAB 10) / Bundesgesundheitsministerium. – Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 1991. – 1516 seiten.

94. DSM Group. Аптечные продажи венотонизирующих средств / DSM Group // Московские аптеки. - 2013. - №4 — С. 20-23.
95. Ekor, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety / M. Ekor // *Frontiers in Pharmacology*. – 2014. - No. 4. – Article 177.
96. Genaust, H. *Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen* / H. Genaust. - Auflage 3., vollst. überarb. Aufl. – Nikol, 2005. – 701 seiten.
97. GRIN Genera of Sapindaceae subfam. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/splist.pl?245> (дата обращения 22.02.2017).
98. GRIN Genera of Sapindaceae subfam. Hippocastanoideae [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.ars-grin.gov.4/cgi-bin/npgs/html/gnlist.pl?2226> (дата обращения 22.02.2017).
99. Güney, G. The apoptotic effects of escin in the H-ras transformed 5RP7 cell line / G. Güney, H.M. Kutlu, A. Işcan // *Phytotherapy Research*. - June 2013. - Vol. 27, No. 6. - P. 900-905.
100. Harborne, J.B. *The flavonoids* / J.B. Harborne, T.J. Mabry, H. Mabry. - London: Chapman and Hall, 1974. - 1202 p.
101. ITIS Standard Report Page: Fagaceae [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19275 (дата обращения 22.02.2018).
102. Kaidar–Person, O. Hemorrhoidal disease: A comprehensive review. / O. Kaidar–Person, B. Person, S.D. Wexner. // *J. Am. Coll. Surg.* - 2007. – No. 204(1). - P. 102–117.
103. Little, E.L. *Nation Audubon Society Field Guide to North American Trees, Eastern Region.* / E.L. Little. – Knopf, 1980. – 714 p.
104. Mabry, T.J. *The Systematic Identification of Flavonoids* / T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B Thomas. - Berlin; Heidelberg, New York, 1970. - 354 p.

105. Millspaugh, Ch. F. American Medicinal Plants / Ch. F. Millspaugh. - NY: Dover Publications, Inc., 1974. – 806 p.
106. Mojžišová, G. Antiproliferative and antiangiogenic properties of horse chestnut extract / G. Mojžišová, J. Mojžiš, M. Pilátová, L. Varinská, L. Ivanová, L. Strojný, J. Richnavský // *Phytotherapy Research*. - February 2013. - Vol. 27, No. 2. - P. 159-165.
107. Pal, S.K. Herbal medicine: current status and the future / S.K. Pal, Y. Shukla // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. - 2003. – No. 4(4). - P. 281-288.
108. Pharmacopée Française. - X edition. - Vol. 1: Monographies. - Paris: Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, 1983-2000.
109. Pharmacopée Française. - X edition. - Vol. 3: List des plantes médicinales de la Pharmacopée Française X édition. - Paris: Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, 2005.
110. Schmeil-Fitschen interaktiv [Электронный ресурс]. – CD-Rom. / Siegmund Seybold. – Wiebelsheim: Quelle & Meyer, 2002. / - Загл. с экрана.
111. United States Pharmacopoeia 32 ed. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.uspbper.com> (дата обращения 25.02.2019).
112. Wagner, H. Die DC- und HPLC-Analyse der Eleutherococcus Droge / H. Wagner, Y.H. Heuer, A. Obermeier et al. // *Planta Medica*. -1982. - Vol. 44, No. 2. - P. 193-198.
113. Wang, Y.-W. Escin augments the efficacy of gemcitabine through down-regulation of nuclear factor- κ B and nuclear factor- κ B-regulated gene products in pancreatic cancer both in vitro and in vivo / Y.-W. Wang, S.-J. Wang, Y.-N. Zhou, S.H. Pan, B. Sun // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. - May 2012. - Vol. 138, No. 5. - P. 785-797.
114. XuMuK.ru - Эсфлазид. Фармацевтический справочник [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.xumuk.ru/farmaceut/784.html> (дата обращения 09.07.2018).

115. Zhang, F. Synergistic protective effects of escin and low-dose glucocorticoids on blood-retinal barrier breakdown in a rat model of retinal ischemia / F. Zhang, Y. Li, L. Zhang, G. Mu // *Molecular Medicine Reports*. - May 2013. - Vol.7, No. 5. - P. 1511-1515.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Акты о внедрении результатов диссертационного исследования

«Утверждаю»

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук,
профессор



И.Л. Давыдкин

ноября 2019 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы

Белова Павла Викторовича «Фармакогностическое исследование каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) как перспективного источника биологически активных веществ» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии: зав. кафедрой, д. фарм. н., профессора В.А. Куркина, д. фарм. н., доцента В.Б. Браславского, доцента, д. фарм. н. О.Е. Правдивцевой подтверждает использование материалов диссертационного исследования Белова П.В., посвященного фармакогностическому исследованию и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов, каштана конского обыкновенного, в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, ординаторами и аспирантами, а также в научно-исследовательской работе.

Внедренные результаты способствуют разработке объективных методик диагностики и определения качества сырья каштана конского обыкновенного и препаратов на его основе. Используемые результаты исследования химического состава, а также разработанные подходы для стандартизации сырья являются методической и методологической основой для научного обоснования создания препаратов на основе каштана конского обыкновенного.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н., профессор

В.А. КУРКИН

Доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н., доцент

В.Б. БРАСЛАВСКИЙ

Доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
д. фарм. н., доцент

О.Е. ПРАВДИВЦЕВА

443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89



«Утверждаю»
 Проректор по научной работе
 ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
 лауреат премии Правительства РФ,
 доктор медицинских наук,
 профессор


И.Л. Давыдкин

« 19 » ноября 2019 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
 Белова Павла Викторовича «Фармакогностическое исследование каштана конского
 обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) как перспективного источника биологически
 активных веществ» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по
 специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические
 науки) на кафедре химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава
 России

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии фармацевтического факультета:
 зав. кафедрой химии фармацевтического факультета, к. фарм.н., доцента А.В. Воронина
 доцента, к.х.н. С.Х. Шариповой, доцента, к.б.н. Н.В. Расцветовой подтверждает
 использование материалов диссертационного исследования Белова П.В., посвященного
 изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию
 подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных
 препаратов, каштана конского обыкновенного, в учебном процессе при проведении
 практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в
 области изучения лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды.

Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации
 лекарственных препаратов на основе каштана конского обыкновенного.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой химии фармацевтического факультета,
 к. фарм. н., доцент

 А.В. ВОРОНИН

Доцент кафедры химии фармацевтического факультета,
 к. х. н., доцент

 С.Х. ШАРИПОВА

Доцент кафедры химии фармацевтического факультета,
 к. б. н., доцент

 Н.В. РАСЦВЕТОВА

«Утверждаю»

Начальник центра ГБУЗ
«Центр контроля качества
лекарственных средств
Самарской области»

О.В. ОСИПОВА

2019 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Белова Павла Викторовича «Фармакогностическое исследование каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) как перспективного источника биологически активных веществ» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

Комиссия в составе сотрудников ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» заместителя начальника центра Жнякиной Л.Е., провизора-аналитика Власовой Г.И., провизора-аналитика Мироновой Е.Е. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Белова П.В., посвященного фармакогностическому исследованию каштана конского обыкновенного при анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. Разработанные методики качественного и количественного анализа апробированы в процессе работы Центра. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование ТСХ и УФ-спектроскопии в присутствии стандартного образца рамноцитрина. Методики определения подлинности сырья и препаратов каштана конского, а также методики определения суммы флавоноидов в сырье воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Белова П.В. будет способствовать повышению объективности стандартизации лекарственного растительного сырья каштана конского обыкновенного, а также лекарственных препаратов на основе данного вида сырья.

Члены комиссии:

Заместитель начальника ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», кандидат фармацевтических наук

 Л.Е. ЖНЯКИНА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

 Г.И. ВЛАСОВА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

 Е.Е. МИРОНОВА

«Утверждаю»

Генеральный директор

ЗАО «Самаралектравы»



Н.Д. ЛУЖНОВ

2019 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Белова Павла Викторовича «Фармакогностическое исследование каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) как перспективного источника биологически активных веществ» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» в ЗАО «Самаралектравы»

Комиссия в составе сотрудников ЗАО «Самаралектравы» зав. производством ЗАО «Самаралектравы» А.Н. Загорянского, главного инженера А.В. Никитенкова подтверждает использование материалов диссертационного исследования Белова П.В., посвященного исследованию химического состава, а также разработке методик сырья каштана конского обыкновенного, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации нового вида лекарственного растительного сырья - «Каштана конского обыкновенного почки» и лекарственного растительного препарата - «Каштана конского почек настойка» в работе предприятия.

Разработанные методики качественного и количественного анализа сырья и препаратов каштана конского обыкновенного апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных препаратов на основе каштана конского обыкновенного.

Члены комиссии:

Заведующий производством ЗАО «Самаралектравы»  А.Н. ЗАГОРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»  А.В. НИКИТЕНКОВ

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Самарская фармацевтическая
фабрика»

 **М.С. Глебов**
« 5 » ноября 2019 г.

446112, Самарская обл., г. Чапаевск,
1-ая Монтажная ул., д. 12а, офис 5

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

результатов диссертационной работы

Белова Павла Викторовича «Фармакогностическое исследование каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) как перспективного источника биологически активных веществ» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «фармацевтическая химия, фармакогнозия» в ООО «Самарская фармацевтическая фабрика»

Результаты диссертационной работы Белова П.В., посвященные исследованию химического состава, а также разработке методик анализа сырья каштана конского обыкновенного, обоснованию подходов к стандартизации нового вида лекарственного растительного сырья - «Каштана конского обыкновенного почки» и лекарственного растительного препарата - «Каштана конского почек настойка», используются в условиях производства ООО «Самарская фармацевтическая фабрика».

Внедренные результаты способствуют научному обоснованию целесообразности использования нового вида лекарственного растительного сырья на основе каштана конского обыкновенного, а также созданию импортозамещающих растительных лекарственных препаратов на основ данного вида сырья.

Главный технолог
ООО «Самарская фармацевтическая фабрика»
« 5 » ноября 2019 г.



Д.С. Зуев



Приложение 2. Патент на изобретение «Способ получения вещества, обладающего противогрибковой активностью»



**Приложение 3. Проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС
«Каштана конского обыкновенного почки»**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

УТВЕРЖДАЮ

Директор Центра фармакопеи и
международного сотрудничества
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств
медицинского применения», доктор
фармацевтических наук, профессор

_____ **Е.И. САКАНЯН**

«__» _____ 20__ г.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО
СРЕДСТВА**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Каштана конского обыкновенного
почки

ФС.2.5. .
Вводится впервые

Aesculi hippocastani gemmae

Срок введения установлен
с «__» _____ 20__ г.
до «__» _____ 20__ г

Собранные ранней весной до начала распускания и высушенные боковые и верхушечные почки дикорастущего и культивируемого дерева каштана конского обыкновенного – *Aesculus hippocastanum* L., сем. конскокаштановых – *Hippocastanaceae*.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении невооруженным глазом или под лупой (10х) почки остроконечные, вытянуто-яйцевидной формы. Длина почек от 7 до 25 мм, в поперечнике - от 5 до 15 мм. Почки плотные, с поверхности неопушенные, клейко-смолистые. Цвет их неоднородный, от темно-бурого до желто-зеленого. Кроющие чешуи расположены черепитчато. Поперечное сечение почек имеет округлую форму. Почкосложение в медиальной части полуобъемлющее, листосложение - складчатое.

Запах почек слабый, специфический, вкус водного настоя слабо вяжущий, специфический.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* При рассмотрении поверхности кроющей чешуи почки с внешней стороны должны быть видны локализованные ближе к основанию одноклеточные бичевидные волоски, при облучении УФ-светом с $\lambda=360$ нм и $\lambda=420$ нм люминесцирующие одинаково бурым цветом. Эпидермис внешней стороны чешуи мелкоклеточный, сложен из угловатых паренхимных клеток. Клеточные стенки эпидермальных клеток бурого цвета.

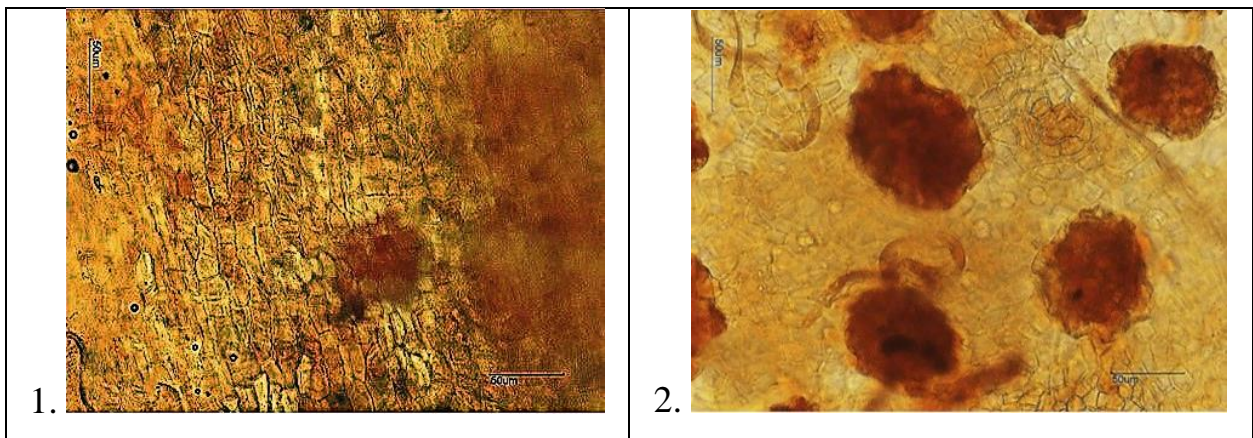
Поверхность внутренней стороны кроющих чешуй должна быть густо покрыта крупными головчатыми трихомами – железками, ближе к основанию чешуй также могут встречаться одноклеточные бичевидные волоски. Железка имеет многоклеточную ножку, сложенную округлыми по форме клетками с бурым протопластом. Головка железки также многоклеточная, состоит из тонкостенных смятых клеток с аморфным, слабо окрашенным протопластом. Железки при облучении УФ светом ($\lambda=360$ нм) должны иметь ярко-голубую люминесценцию, при облучении светом с $\lambda=420$ нм клетки ножки светятся бурым цветом, головки – желтым.

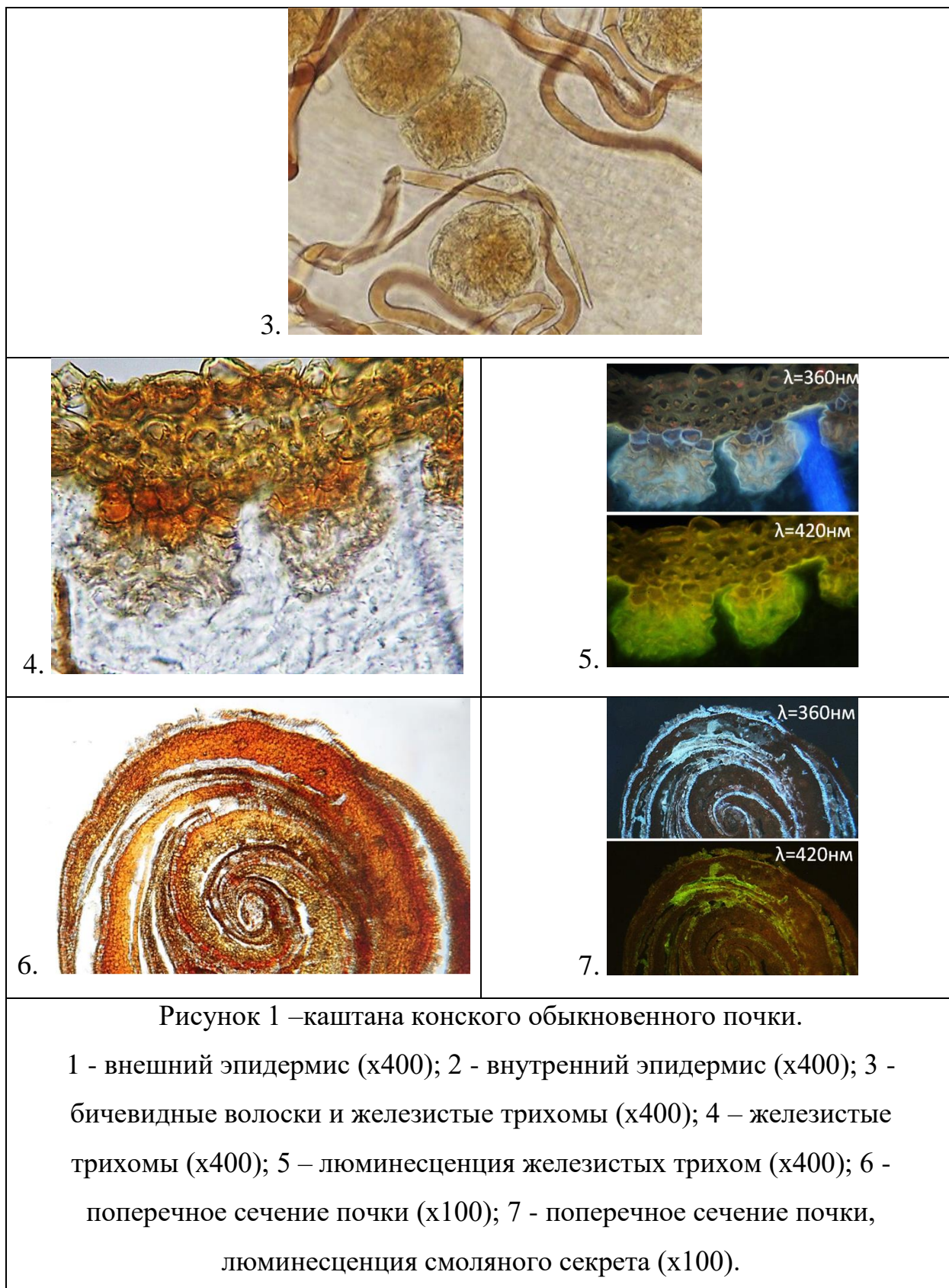
Внутренняя эпидерма чешуй имеет тонкостенные клетки с клеточными стенками светло-желтого цвета. В эпидерме должны быть видны устьичные аппараты анамоцитного типа.

Опушение внутренних кроющих чешуй подобно опушению наружных, однако встречаемость железистых трихом значительно ниже. Бичевидные волоски, напротив, густо покрывают адаксиальные поверхности катафиллов.

На поперечном сечении кроющие чешуи бурые, с более светлой многослойной пробкой на поверхности. Проводящие пучки мелкие, неармированные. На поверхности чешуй должен быть заметен слабоокрашенный смолянистый секрет, склеивающий чешуи между собой. При облучении тканей на поперечных срезах УФ-светом с $\lambda=360$ нм смолянистый секрет должен светиться светло-голубым цветом, при облучении светом с $\lambda=420$ нм - светло-желтым цветом.

Примордии почек упакованы под кроющими чешуями особым образом. Листочки примордиев сложены пополам по центральной жилке. Их листовые пластинки волнообразно смяты по вторичным жилкам. Листовые пластинки сильно опушены бичевидными многоклеточными волосками с темно-бурым протопластом клеток.





Определение основных групп биологически активных веществ

К 1 мл полученного извлечения, приготовленного как указано в разделе «Количественное определение», прибавляют прибавляли 2 мл 3% раствора алюминия (III) хлорида спиртового, через 20-30 минут появляется зеленовато-желтое окрашивание.

УФ-спектрофотометрия

Раствор А, приготовленный как указано в разделе «Количественное определение» имеет максимумы поглощения при длинах волн 280 ± 2 нм, 340 ± 2 нм, 420 ± 2 нм (рис. 2).

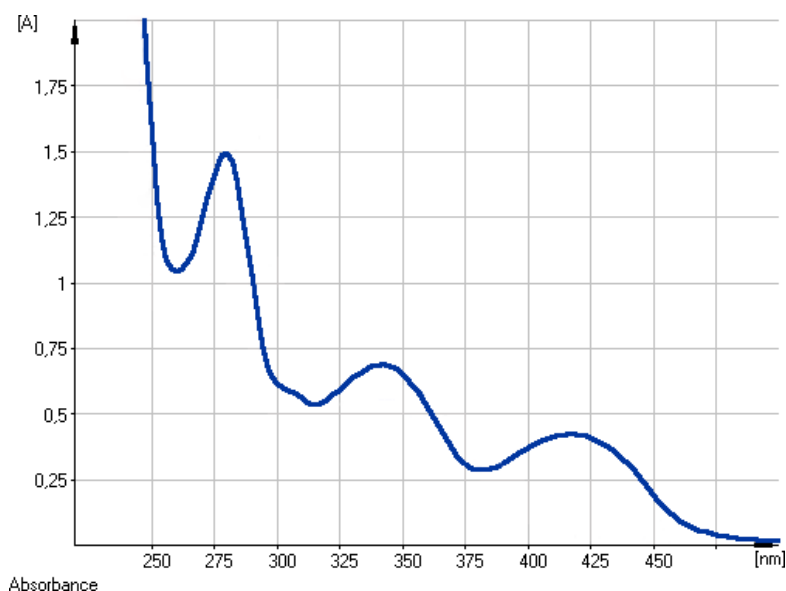


Рисунок 2 – Электронный спектр водно-спиртового извлечения из почек каштана конского

1. Тонкослойная хроматография

Раствор стандартного образца (СО) лютеолина. Около 0,02 г (точная навеска) лютеолина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20-30 мл спирта этилового 70% при нагревании на водяной бане, доводят спиртом этиловым 70% до метки и перемешивают.

Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» или «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» предварительно активируют в сушильном шкафу

при температуре 100-105°C (1 час). На линию старта пластинки микропипеткой наносят 0,02 мл водно-спиртового извлечения, полученного в разделе «Количественное определение». В качестве вещества-свидетеля используют спиртовой раствор СО лютеолина. Пластинку помещают в хроматографическую камеру, насыщенную парами смеси растворителей *хлороформ – спирт этиловый* (19:1). Хроматографируют восходящим способом.

После того, как фронт растворителя проходит около 8 см, пластинку достают из камеры, высушивают и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм. При этом на хроматограмме обнаруживается темно-синее пятно (254 нм), с R_f около 0,5, соответствующее лютеолину, и темно-синие (254 нм) и желто-зеленые (366 нм) пятна с величиной R_f около 0,7, соответствующие рамноцитрину. Затем хроматограмму проявляют 3% спиртовым раствором алюминия (III) хлорида и высушивают. Пятна приобретают желтое окрашивание. Допускается обнаружение других окрашенных зон.

После происходит расчет величины R_{st} , равной отношению коэффициента удерживания (R_f) рамноцитрина к коэффициенту удерживания лютеолина. Величина R_{st} должна быть равна 1,4.

$$R_{st} = \frac{R_f \text{ (рамноцитрин)}}{R_f \text{ (лютеолин)}} = \frac{0,7}{0,5} = 1,4$$

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье* – не более 8%.

Зола общая. *Цельное сырье* – не более 10%.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье* – не более 1%.

Посторонние примеси.

Веточки, в т.ч. отделенные при анализе. Цельное, измельченное сырье: не более 10%.

Почки, тронувшиеся в рост и распустившиеся. Цельное сырье – не более 2%.

Органическая примесь. Цельное сырье: не более 1%.

Минеральная примесь. Цельное сырье: не более 0,5%.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» (ГФ РФ XIV издания).

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* содержание суммы флавоноидов в пересчете на рамноцитрин не менее 1,0%, экстрактивных веществ не менее 14%.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу

охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса). Испытуемый раствор готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 96% спиртом этиловым (испытуемый раствор А).

В качестве раствора сравнения используют раствор, полученный следующим образом: 1 мл извлечения (1:50) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96% до метки.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 422 нм через 30 минут после приготовления всех растворов.

Для расчета содержания суммы флавоноидов используют теоретическое значение удельного показателя поглощения рамноцитрина при длине волны 422 нм, равное 260.

Содержание суммы флавоноидов (x в процентах) в пересчете на рамноцитрин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$x = \frac{D * 25 * 25 * 100}{m * 260 * (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

m_o – масса РСО рамноцитрина, г;

260 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) РСО рамноцитрина при 422 нм;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Определение экстрактивных веществ. В соответствии с ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания) (метод 1, навеска сырья 1,0 г, экстрагент – 70% спирт этиловый).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ РФ XIV издания).

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ РФ XIV издания).

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук,
профессор



И.Л. Давыдкин

«___» _____ 2019 г.

Заведующий кафедрой
фармакогнозии с ботаникой
и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
доктор фармацевтических наук,
профессор

В.А. Куркин

«09» 12 _____ 2019 г.

Очный аспирант кафедры
фармакогнозии с ботаникой
и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России

П.В. Белов

«05» 12 _____ 2019 г.