ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Дунилин Александр Денисович

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЦВЕТКОВ КАШТАНА КОНСКОГО РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНОВ ПРОИЗРАСТАНИЯ

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Тринеева Ольга Валерьевна

Воронеж 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 7

ГЛАВА 1. КАШТАН КОНСКИЙ КАК ОБЪЕКТ СОВРЕМЕННЫХ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПОТЕНЦИАЛ ЕГО МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ 16

1.1. Описание таксона Каштан конский обыкновенный (*Aesculus hippocastanum* L.) 16

1.2. Ботаническая характеристика растения 17

1.3. Микроскопические признаки сырья каштана конского 18

1.4. Ареал произрастания 21

1.5. Химический состав сырья каштана конского 22

1.6. Методы определения тритерпеновых сапонинов в сырье каштана конского .. 26

1.7. Сравнительный анализ требований национальных фармакопей к качеству сырья каштана конского 37

1.8. Заготовка сырья 38

1.9. Фармакологические свойства сырья каштана конского 40

1.10. Маркетинговое исследование рынка лекарственных препаратов на основе сырья каштана конского 47

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1 50

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 53

2.1. Характеристика объекта исследования 53

2.2. Макро- и микроскопическое исследование 54

2.3. Определение показателей качества 55

2.4. Определение элементного состава 56

2.5. Определение радионуклидов 57

2.6. Определение остаточных пестицидов 57

2.7. Определение суммы экстрактивных веществ 57

2.8. Качественный анализ биологически активных веществ 58

2.9. Количественное определение биологически активных веществ 59

2.10. Изучение профиля ИК-спектров цветков каштана конского 62

2.11. Изучение фармакологического действия цветков каштана конского 62
2.12. Выбор оптимальных лекарственных форм 67
2.13. Характеристика реактивов и материалов 69
2.14. Описание использованных стандартных образцов 69
2.15. Статистическая обработка результатов 70
2.16. Определение срока хранения и стабильности растительного сырья 70
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ АНАТОМО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ, МОРФОЛОГИИ И ДРУГИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОДЛИННОСТИ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННОСТИ ЦВЕТКОВ КАШТАНА КОНСКОГО 71
3.1. Изучение внешних признаков цветков каштана конского 71
3.2. Микроскопические признаки цветков каштана конского 73
3.3. Растровая электронная микроскопия цветков каштана конского 83
3.4. Определение показателей качества цветков каштана конского 87
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3 89
ГЛАВА 4. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЦВЕТКОВ КАШТАНА КОНСКОГО 92
4.1. Элементный состав цветков каштана конского на примере сырья, заготовленного на территории Воронежской области 93
4.2. Определение в цветках каштана конского радионуклидов 97
4.3. Определение в цветках каштана конского остаточных пестицидов 98
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4 99
ГЛАВА 5. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦВЕТКОВ КАШТАНА КОНСКОГО 100
5.1. Определение экстрактивных веществ 100
5.2. Качественный анализ биологически активных веществ цветков каштана конского 102
5.3. Количественное определение фенольных соединений в цветках каштана конского 103
5.3.1. Определение флавоноидов в цветках каштана конского 103

5.3.1.1. Разработка и валидация методики определения флавоноидов в цветках каштана конского 103

5.3.1.2. Определение флавоноидов цветков каштана конского методом ТСХ 112

5.3.2. Определение лейкоантоцианов в цветках каштана конского 119

5.3.2.1. Разработка и валидация методики определения лейкоантоцианов в цветках каштана конского 120

5.3.2.2. Определение лейкоантоцианов цветков каштана конского методом ТСХ 129

5.3.3. Определение дубильных веществ в цветках каштана конского 130

5.4. Исследование стериновой фракции биологически активных веществ цветков каштана конского 131

5.4.1. Определение стеринов в цветках каштана конского 132

5.4.2. Определение сапонинов в цветках каштана конского 134

5.4.2.1. Разработка и валидация методики определения тритерпеновых сапонинов в цветках каштана конского 134

5.4.2.2. Разделение тритерпеновых сапонинов цветков каштана конского методом ТСХ 144

5.5. Определение некоторых других групп биологически активных веществ в цветках каштана конского 146

5.5.1. Определение углеводного комплекса биологически активных веществ цветков каштана конского 147

5.5.1.1. Количественное определение полисахаридов в цветках каштана конского различными методами 147

5.5.1.2. Определение углеводного комплекса биологически активных веществ цветков каштана конского методом ТСХ 152

5.5.2. Аминокислоты и органические кислоты 155

5.5.2.1. Исследование состава аминокислот цветков каштана конского методом ТСХ 155

5.5.2.2. Количественное определение аминокислот в цветках каштана конского 157

5.5.2.3. Определение органических кислот в цветках каштана конского 162

5.6. Оценка динамики накопления биологически активных веществ в цветках каштана конского 167

5.7. Оценка взаимного влияния на накопление биологически активных веществ в цветках каштана конского различных регионов произрастания 171

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5 172

ГЛАВА 6. ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ ВОЗМОЖНЫХ ВИДОВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЦВЕТКОВ КАШТАНА КОНСКОГО И ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ИХ ОСНОВЕ 176

6.1. Прогноз фармакологической активности биологически активных веществ цветков каштана конского методом *in silico* 176

6.2. Оценка антиокислительной активности водных извлечений из цветков каштана конского 177

6.3. Изучение биостимулирующего и/или биоцидного и мембранопротекторного действия настоя цветков каштана конского *in vitro* с использованием тест-системы инфузорий *Paramecium caudatum* в тестах «Острая токсичность» и «Функциональная нагрузка» 190

6.4. Оценка антимикробной и фунгицидной активности жидкого экстракта на основе цветков каштана конского 196

6.5. Выбор оптимальных лекарственных форм на основе цветков каштана конского и их стандартизация 199

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6 212

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 215

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ 216

Практические рекомендации 218

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ 219

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 220

ПРИЛОЖЕНИЯ 259

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Одной из ключевых задач фармакогнозии является комплексное изучение уже известных лекарственных растений с целью расширения перечня используемых в медицине морфологических групп растительного сырья и выявления у них дополнительных, ранее не описанных фармакологических свойств.

В Российской Федерации (РФ) интерес к лекарственным растениям как к источнику сырья для производства лекарственных препаратов (ЛП) является стабильным, что согласуется с общемировыми тенденциями. Так, перспективным лекарственным растением является каштан конский обыкновенный (*Aesculus hippocastanum* L.) – растение рода конский каштан (*Aesculus* L.), семейства конскокаштановые (*Hippocastanaceae*), который широко используется в научной и народной медицине многих стран. Большое количество работ посвящено изучению химического состава и особенностей применения в медицине семян каштана конского. На фармацевтическом рынке РФ присутствует небольшое количество ЛП на основе семян каштана венотонизирующего действия: «Эскузан», «Веноплант», «Ангионорм» и «Конского каштана экстракт жидкий», действующим компонентом которых являются тритерпеновые сапонины. Биофлавоноиды флеботропного действия, представлены ЛП на основе рутина, троксерутина, диосмина и гесперидина. Последние производятся за рубежом и имеют достаточно высокую стоимость курсового лечения. В народной медицине наряду с семенами используются цветки каштана конского обыкновенного, являющиеся малоизученным лекарственным растительным сырьём (ЛРС) с точки зрения фитохимического состава и фармакологической активности. Однако в научной литературе имеются отдельные фрагментарные данные об уникальном комплексе флавоноидов и сапонинов, что делает цветки каштана конского обыкновенного также перспективным ЛРС для фармакогностического изучения с целью дальнейшей разработки отечественных эффективных и безопасных лекарственных растительных препаратов (ЛРП) флеботропного действия на основе ежегодно возобновляемого доступного сырья. Данные об особенностях

регионального накопления биологически активных веществ (БАВ) в цветках данного растения отсутствуют. Для научного обоснования числовых значений показателей качества ЛРС, включаемых в нормативную документацию (НД), необходимо изучать их зависимость от эколого-географических условий произрастания во всех регионах РФ, где распространено производящее растение в диком виде или широко культивируется. Поэтому сравнительное фармакогностическое изучение цветков каштана конского различных регионов произрастания, как перспективного вида ЛРС в настоящее время следует считать актуальной задачей, решение которой будет способствовать расширению сырьевой базы лекарственных растений и созданию новых эффективных ЛРП.

Степень разработанности темы исследования. В Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) XV изд. присутствует фармакопейная статья (ФС) на семена каштана конского обыкновенного (ФС.2.5.0117).

Отечественные исследования внесли существенный вклад в изучение каштана конского. Работы Белова П.В. и Куркина В.А. (2020) были посвящены комплексному фармакогностическому исследованию различных органов растения как перспективного источника БАВ. Исследования Савченко Л.Н. и соавт. (2015) разрабатывали технологию и методы анализа жидкого экстракта из листьев и цветков каштана конского, обладающего противовоспалительной и венотонизирующей активностью. Значительный вклад в изучение биохимических особенностей внесли работы Жаровой О.Г. и соавт. (2008) по исследованию липидного комплекса семян, а также исследования Филатовой А.В. и соавт. (2022) в области технологии выделения полисахаридов из оболочек плодов.

Зарубежные исследования расширили понимание биоразнообразия и биохимических особенностей каштана конского. Работа Chwil M. et al. (2014) детально описала микроморфологию трихом в цветках каштана конского, что имеет важное значение для разработки диагностических признаков сырья. Исследования Bielarska A.M. et al. (2022) продемонстрировали высокий антиоксидантный потенциал и содержание полифенолов в цветках и листьях

растения. Многочисленные клинические исследования (Pittler M., Ernst E., 1998; Siebert U. et al., 2002) подтвердили эффективность экстракта семян каштана конского при хронической венозной недостаточности. Современные исследования Walas Ł. et al. (2025) посвящены изучению истории интродукции растения в Европе, а работы Hanaka A. et al. (2023) исследуют биохимические изменения при инфестации растения вредителями и болезнями.

Несмотря на значительный объем проведенных исследований, комплексные работы по стандартизации именно цветков каштана конского остаются фрагментарными. Отсутствуют унифицированные методики микроскопического анализа диагностических признаков сырья, недостаточно изучена вариабельность содержания основных групп БАВ в зависимости от региона произрастания, не разработаны современные валидированные методы анализа БАВ для данного вида сырья и лекарственных форм (ЛФ) на его основе.

Цель исследования – сравнительное фармакогностическое изучение и разработка подходов к стандартизации цветков каштана конского различных регионов произрастания, как нового вида лекарственного растительного сырья – перспективного источника биологически активных веществ.

Задачи исследования:

1. Провести анатомо-морфологическое исследование и выявить различными методами микроскопического анализа диагностически значимые признаки цветков каштана конского;

2. Разработать нормативы товароведческих показателей качества цветков каштана конского обыкновенного;

3. Провести оценку безопасности применения цветков каштана конского по способности к накоплению экотоксикантов;

4. Разработать и валидировать методики количественного определения суммы флавоноидов и сапонинов в цветках каштана конского обыкновенного и жидких водно-спиртовых лекарственных форм на его основе как целевых групп биологически активных веществ;

5. С применением комплекса методов физико-химического анализа изучить региональную вариабельность профиля биологически активных веществ различных групп в сырье;

6. Определить целесообразные направления дальнейшей разработки лекарственных растительных препаратов на основе цветков каштана конского по результатам оценки различных видов фармакологической активности *in silico* и *in vitro*;

7. Получить и стандартизировать лабораторные образцы жидких водных и спиртосодержащих лекарственных форм на основе цветков каштана конского;

8. На основе проведенных исследований разработать нормы качества и подготовить проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья – «Конского каштана обыкновенного цветки».

Научная новизна. По результатам проведенных исследований установлена перспективность использования цветков каштана конского как источника БАВ. Впервые было проведено сравнительное фармакогностическое исследование цветков каштана конского различных регионов произрастания, позволяющее установить широту варьирования БАВ, оптимальные сроки заготовки ЛРС с максимальным содержанием БАВ. Впервые методами капиллярного электрофореза (КЭ), газовой хроматографии (ГХ/МС), тонкослойной хроматографии (ТСХ), спектрофотометрии (СФМ), инфракрасной спектроскопии (ИКС) исследован состав БАВ (аминокислоты, органические кислоты, фенольные соединения, тритерпеновые сапонины, стерины и сахара) и отслежена региональная динамика их накопления. Установлены нормативы числовых показателей качества ЛРС. Изучены морфолого-анатомические признаки подлинности сырья, в т.ч. впервые с применением растровой электронной микроскопии.

Установлены особенности накопления тяжелых металлов, а также содержание радионуклидов и остаточных пестицидов в цветках каштана конского. Установлено, что изученные образцы экологически безопасны и могут быть рекомендованы для массовой заготовки.

Впервые разработаны и валидированы методики определения целевых групп БАВ – флавоноидов и тритерпеновых сапонинов (ТС), в цветках каштана конского и жидких лекарственных формах (ЖЛФ) на его основе.

Впервые разработаны и валидированы методики определения лейкоантоцианов и антиокислительной активности (АОА) для цветков каштана конского. Новизна проведенных исследований подтверждена патентом РФ на изобретение № 2862904 от 26.05.2026 «Способ определения антиокислительной активности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов методом обратной цериметрии». Методом компьютерного моделирования *in silico* определены основные виды фармакологической активности и побочных действий комплекса БАВ цветков. АОА извлечений на основе цветков каштана подтверждена комплексом титриметрических и спектрофотометрических методов. С использованием тест-системы инфузорий *Paramecium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка» впервые установлено, что настой цветков каштана *in vitro* проявлял мембранопротекторную активность. В тесте «Острая токсичность» подтверждена безопасность настоя цветков. Полученные данные по оценке потенциальных видов фармакологической активности позволяют предложить данное ЛРС для разработки препаратов на его основе, обладающих флеботропной, антиоксидантной и мембранопротекторной активностью.

Теоретическая и практическая значимость. Экспериментальный материал, представленный в работе, содержит новые данные о химическом составе БАВ в цветках каштана конского и его эколого-географической изменчивости на территории Европейской части РФ. Исследования подтвердили перспективность использования цветков наравне с семенами в качестве источника ТС и флавоноидов. В результате изучения морфолого – анатомических признаков, товароведческого и фитохимического анализа установлены основные параметры подлинности и показатели, характеризующие доброкачественность растительного сырья. Даны рекомендации по заготовке и срокам хранения сырья. Подготовлен проект ФС «Конского каштана обыкновенного цветки» для ГФ РФ, принятый на

рассмотрение в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ.

Методология и методы исследования. Теоретическую основу исследования составили труды российских (Белов П.В., Куркин В.А., Жарова О.Г., Саушкина А.С., Савченко Л.Н., Постоюк Н.А.) и зарубежных (Bielarska AM., Chwil M., Dudek-Makuch M., Owczarek A., Zhang Z., Wang Y.) ученых, которые были взяты за основу при проведении комплексного фармакогностического изучения цветков каштана конского. Методология исследования включала в себя проведение морфолого-анатомического, всестороннего химического, фармакологического изучения цветков каштана конского различных регионов произрастания. В процессе выполнения диссертационной работы использовались методы сравнительного и документального анализа, а также комплекс физико-химических методов и технологических испытаний, методы математической статистики и обработки результатов анализа.

Личный вклад автора. При непосредственном участии автора были определены цели и задачи исследования, автором проведен анализ российской и зарубежной научной литературы. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов исследования, написании публикаций по теме исследования. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от постановки задач, их теоретической и практической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях, докладах и внедрения их в практику. Диссертация и автореферат написаны автором лично.

Достоверность научных положений и выводов. Оценка уровня достоверности полученных результатов и выводов определяется большим объемом проанализированной отечественной и иностранной информационной базы, проведением достаточного количества экспериментальных исследований с использованием современных физико-химических методов анализа. В работе

использовалось сертифицированное оборудование, на которое выданы действующие свидетельства о поверке.

Апробация работы. Основные результаты исследования доложены на конференциях различного уровня: IX Международная научно-методическая конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (Воронеж, 2023 г.), Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» (Пятигорск, 2024 – 2026 г.), II-IV Региональные научно-практические конференции «Современные аспекты обращения лекарственных средств» (Воронеж, 2024 – 2026 г.), XXV - XXVI Международные съезды «ФИТОФАРМ» (Санкт-Петербург, 2024 – 2025 г.), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 175-летию открытия явления ионного обмена и 25-летию журнала «Сорбционные и хроматографические процессы» (Воронеж, 2025 г.). Апробация результатов диссертации состоялась на межкафедральном заседании (протокол № 1506 – 17) от 30.06.2026 г.).

Внедрение результатов исследования. Полученные в ходе диссертационного исследования данные сравнительного фармакогностического изучения цветков каштана конского различных регионов произрастания использованы при разработке проекта ФС «Конского каштана обыкновенного цветки» для ГФ РФ. Материалы диссертационного исследования рекомендованы к внедрению для проведения учебных занятий при реализации дисциплины «Фармакогнозия» и учебной практики по фармакогнозии для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация» (ВО); дисциплины «Фармакогнозия» и производственной практики по фармакогнозии для ординаторов, обучающихся по специальности 33.08.03 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия», а также при реализации МДК «Лекарственные растительные препараты» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 «Фармация» (СПО), при проведении научно-исследовательских работ по стандартизации и

оценке качества ЛРС (акт внедрения №1506-89 от 26.01.2026), также при проведении занятий на курсах повышения квалификации провизоров и фармацевтов по ДПО «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» по тематике фармакогностического анализа и проблем идентификации нефармакопейных морфологических частей фармакопейных видов лекарственных растений, произрастающих на территории Центрального Черноземья (акт внедрения №1500-11 от 26.01.2026) на фармацевтическом факультете Воронежского госуниверситета, а также для проведения учебных занятий бакалавров по направлению подготовки 35.03.01 «Лесное дело», профиль – Защита леса и охотоведение на лесном факультете Воронежского государственного лесотехнического университета (акт внедрения №3 от 24.11.2025). Разработана и утверждена инструкция по сбору и сушке каштана конского обыкновенного цветков для работы ботанического сада им. проф. Б.М. Козо-Полянского ВГУ.

Связь задач исследования с планами научных работ. Диссертационная работа была выполнена в рамках плана и в соответствии с тематикой научно-исследовательской работы кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертационной работы соответствуют формуле специальности, 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно пункту 5, 6 и 7 паспорта.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования анатомо-диагностических признаков цветков каштана конского обыкновенного с применением различных методов микроскопического анализа;

2. Результаты оценки накопления экотоксикантов цветками каштана конского обыкновенного;

3. Результаты всестороннего определения различных групп БАВ в цветках каштана конского различных регионов произрастания с помощью современных физико-химических методов;

4. Результаты разработки и валидации методик определения фенольных соединений (флавоноидов и лейкоантоцианов) и тритерпеновых сапонинов в цветках;

5. Результаты стандартизации водно-спиртовых извлечений на основе цветков каштана конского обыкновенного;

6. Результаты изучения региональной вариабельности накопления основных групп БАВ и рекомендуемых нормативов качества цветков каштана конского;

7. Результаты прогностической (*in silico*) и скрининговой доклинической (*in vitro*) оценки различных перспективных видов фармакологической активности комплекса БАВ цветков.

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 25 печатных работ, в том числе 13 статей в журналах, включенных ВАК в перечень рецензируемых научных изданий, из которых 3 статьи опубликовано в журналах, входящих в международные реферативные базы данных, получен 1 патент РФ на изобретение № 2862904.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 283 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех экспериментальных глав, выводов, библиографического указателя, включающего 275 источников, в т.ч. 82 на иностранном языке, и 11 приложений (24 стр.). Работа содержит 84 рисунка и 87 таблиц.

ГЛАВА 1. КАШТАН КОНСКИЙ КАК ОБЪЕКТ СОВРЕМЕННЫХ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПОТЕНЦИАЛ ЕГО МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Описание таксона Каштан конский обыкновенный (*Aesculus hippocastanum* L.)

Согласно исследованиям в области ботаники и систематики, а таже опираясь на ряд иных литературных источников, можно выделить: «Русскоязычные названия каштана: научные: Конский каштан обыкновенный; тривиальные: Каштан конский, Лжекаштан конский; ограниченно распространённые: Желудник. Систематика: отдел: Цветковые/покрытосемянные (*Magnoliophyta*); класс: Магнолиопсиды/двудольные (*Magnoliopsida*); порядок: Сапиндоцветные (*Sapindales*); семейство: Конскокаштановые (*Hippocastanaceae*); род: Конский каштан (*Aesculus* L.); вид: Каштан конский обыкновенный *(Aesculus hippocastanum* L.)» [11, 196].

В некоторых зарубежных и отечественных источниках: «род *Aesculus* относят к подсемейству *Hippocastanoideae* Burnett семейства Сапиндовые (*Sapindaceae*). Такая классификация обусловлена генетическим сродством вышеобозначенных семейств» [11, 228]. Опираясь на литературные источники необходимо подчеркнуть: «каштан конский, несмотря на свое название, не связан с родом Каштан (*Castanea* Mill.), который относится к семейству Буковые (*Fagaceae* Dumort. nom. Cons.)» [11, 206, 241].

Согласно ряду литературных истоничков, посвященных области систематики: «видовое уточнение «обыкновенный» служит для идентификации *Aesculus* hippocastanum L. в ряду иных разновидностей рода *Aesculus*: *Aesculus assamica* Griff. – Конский каштан ассамский*; *Aesculus californica* (Spach) Nutt. – Конский каштан калифорнийский*; *Aesculus carnea* Zeyher – Конский каштан мясо-красный*; *Aesculus chinensis* Bunge – Конский каштан китайский*; *Aesculus flava* Sol. – Конский каштан жёлтый*; *Aesculus hybrida* DC. – Конский каштан гибридный*; *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 parryi* A. Gray - Конский каштан Парри*; *Aesculus parviflora* Walter – Конский каштан мелкоцветковый*; *Aesculus pavia* L. – Конский каштан красный (конский каштан павия)*» [11, 196, 208, 241].

«* – отсутствует в списке-первоисточнике видов, представленных в пределах бывшего СССР лишь таксонами подвидового ранга» [11, 196].

1.2. Ботаническая характеристика растения

Опираясь на литературные источнки, посвященные ботаническому описанию: «Конский каштан обыкновенный представляет собой крупное листопадное дерево, достигающее 30 метров в высоту. Для него характерна широкая, густая крона. Ствол покрыт серо-бурой корой с заметно выраженными трещинами. Листья супротивные, черешковые, пальчато-сложные (из 5-7 сидячих листочков), диаметром до 25 см, обратно-яйцевидные, заостренные, к основанию клиновидно-суженые, с пильчатым краем; молодые листья в основании жилок рыжеволосистые. Цветки раздельнолепестные, зигоморфные в прямостоячих пирамидальных метелках длиной до 20 – 30 см; ось соцветия и цветоножки с рыжеватым опушением. Чашечка 5-зубчатая, колокольчатая; венчик бахромчатый белого цвета с желтоватым или красноватым пятном, лепестков 5. Плоды – округлые шиповатые зеленые коробочки до 5-6 см в диаметре, при созревании раскрывающиеся тремя створками. Семена крупные, немного сплюснутые, имеют крупное серое пятно у основания (Рисунок 1). Цветет конский каштан в конце весны (май-июнь); период плодоношения приходится на середину осени (сентябрь-октябрь). Естественный ареал конского каштана ограничен территорией Балканского полуострова» [11, 94, 100, 107, 191].

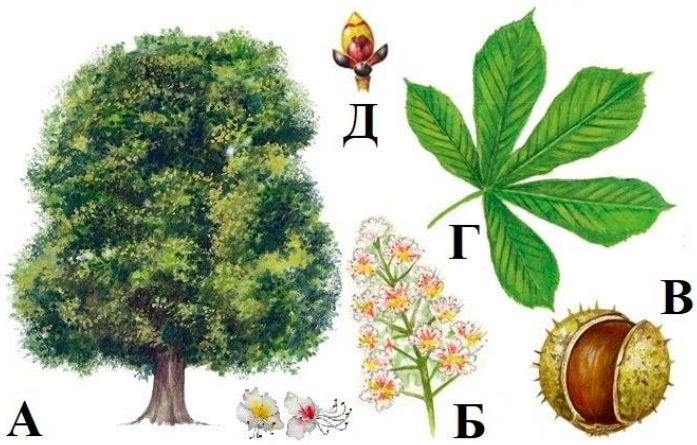


Рисунок 1 – Внешний вид дерева каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) и его морфологических органов: А – общий внешний вид дерева каштана конского; Б –соцветие с цветками; В – плод с семенем внутри; Г –лист; Д – почка

1.3. Микроскопические признаки сырья каштана конского

Морфолого-анатомические исследования различных органов конского каштана обыкновенного представлены в современной научной литературе довольно ограниченно [6, 11]. В частности, Соколов Н.С. с соавторами проводили исследование морфолого-анатомических признаков семян каштана конского методом люминесцентной микроскопии [103]. Анатомо-диагностические характеристики семян каштана детально исследованы и описаны в литературных источниках [2, 11, 58, 59, 103].

Куркин В.А. и Белов П.В. анализировали осевые части сложного листа каштана конского. С применением световой и люминесцентной микроскопий установлено, что поперечные сечения базальных, медиальных и апикальных осевых частей – рахисов различаются по форме: базальная часть С-образная с волнистой поверхностью, медиальная – почти овальная, апикальная – угловатая. Поверхность покрыта эпидермой с тонкой кутикулой, люминесцирующей голубым или желтым светом. Выявлена гиподерма со склерифицированными стенками, наиболее развитая с адаксиальной стороны [11]. Подробно также описано строение проводящей системы пучкового типа [11].

Постоюк Н.А. при микроскопическом исследовании цельного сырья составила описание внешних признаков листьев каштана конского обыкновенного: «с верхней стороны - толстостенные клетки эпидермиса с извилистыми стенками и складчатой кутикулой; с нижней – клетки с извилистыми стенками. Устьица овальные, аномоцитного типа, преимущественно локализованы на нижней стороне, на верхней встречаются реже. По жилкам нижнего эпидермиса и у основания листа обнаружены одиночные простые одноклеточные и 2–4-клеточные волоски с грубо-бородавчатой кутикулой; на верхней стороне они крайне редки. В мезофилле отмечены друзы и призматические кристаллы оксалата кальция, часто расположенные цепочками вдоль жилок, а также клетки губчатой паренхимы с крупными межклетниками (аэренхима). При анализе порошкованного сырья под микроскопом наблюдаются обрывки эпидермиса с сильно извилистыми стенками, устьица аномоцитного типа, характерные волоски, друзы оксалата кальция вдоль жилок и аэренхима» [6, 127].

Среди отечественных научных источников не удалось обнаружить исследований, посвящённых морфологии и анатомии цветков конского каштана. В зарубежной научной литературе присутствуют небольшое число работ, направленных на изучение морфолого-анатомических признаков цветков каштана конского [11]. Так, Мирослава Хвиль и коллеги из университета естественных наук в Люблине, Польша, исследовали типы трихом цветков каштана, которые могут содержать БАВ и дали им характеристику [210]. Анализы проводились с использованием световой (СМ), флуоресцентной (ФМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). На чашелистиках и поверхности завязи были обнаружены три типа волосков, в то время как на лепестках венчика были обнаружены два типа волосков и сосочков. Волоски различаются по длине и количеству клеток. На околоцветнике и пестике головчатых волосков не было, тогда как на завязи были обнаружены сосочковые волоски. Эти секреторные структуры интенсивно окрасились в красный и синий цвета с помощью красителей — Суданового красного и Нильского голубого соответственно.

Особенно интенсивное окрашивание наблюдалось в центральной части головки сосочка и в базальной части стебля, что указывает на высокую концентрацию липидов в этих областях. Гистохимические исследования показали, что «все типы волосков и сосочков содержали липиды или эфирные масла, поэтому их можно отнести к железистым структурам. «Нектарные проводники» отличались более высокой плотностью секреторных волосков, чем на остальной поверхности лепестков. Это позволяет предположить о том, что данные зоны способны излучать более интенсивный аромат» [210].

В работе [272] авторами были отражены особенности морфологии, анатомии и секреторной активности нектарников цветков каштана конского, имеющих ключевое значение в экологии опыления. Соцветия каштана содержат около 73 % функционально мужских цветков с недоразвитой завязью и 27 % обоеполых, при этом нектарники присутствуют в обоих типах, хотя и различаются по размерам. Цветки продуцируют обильный нектар, а также пыльцу. На цветках присутствуют многочисленные сигнальные структуры: жёлто-красные нектарные указатели на лепестках, красные выросты соединительной ткани на полюсах пыльников и красные рыльца. Нектарник цветка представляет собой дольчатый кольцевой диск диаметром 3–4 мм с четырьмя крупными и двумя-тремя мелкими долями, расположенный в цветоложе у основания завязи. На его поверхности обнаружены устьица и многочисленные кутикулярные везикулы, через которые выделяется нектар. Гистологически нектарник дифференцирован авторами на однослойный эпидермис, нектароносную паренхиму, субгландулярную паренхиму и сосудистые пучки с элементами флоэмы, проникающие в базальную часть паренхимы. Гистохимические тесты, проводимые исследователями выявили в клетках нектарника нерастворимые полисахариды, крахмал, липиды, терпеноиды, полифенолы и кумарины, в том числе эскулин, причём фенольные соединения предположительно выполняют защитную функцию от поедания насекомыми [272].

1.4. Ареал произрастания

В научной среде существует несколько концепций происхождения рода *Aesculus,* распространенного по всему северному полушарию, они предполагают как азиатское, так и американское происхождение данного рода [194, 232, 233, 251]. В культуре, как декоративное дерево, широко распространено в условиях средней полосы и юга РФ, однако в настоящее время все больше снижает свою жизнеспособность, декоративные качества и экологическую значимость из-за минирующей моли *Cameraria ohridella*, развития мучнистой росы, вызываемой грибком *Erysiphe flexuosa*, бактериального некроза тканей или так называемой «кровоточащей язвы конского каштана», возбудителем этого заболевания растения является *P. syringae pv. aesculi* — грамотрицательная бактерия, принадлежащая к семейству *Pseudomonadaceae* [207, 235, 243, 253, 254]. Также проводится активное культивирование каштана конского в условиях северо-западных областей и южного Урала. Исследователи подчеркивают, что «растение неплохо переносит затенение и успешно развивается на глинистых, а также илисто-песчаных грунтах. Успешно произрастает и на достаточно сухих чернозёмных грунтах, включая районы степной зоны. Зимостойкость вида достаточна для средней полосы европейской части России, однако на широте Санкт-Петербурга при сильных морозах возможно подмерзание» [11] (Рисунок 2). Более подвержена данному явлению молодая поросль каштана [8, 74, 96, 97, 267]. Несмотря на это и в настоящее время продолжаются попытки интродукции вида на Европейский Север. Здесь каштан конский проходит свой цикл сезонного развития достаточно успешно. Начало вегетации наблюдается в первой декаде мая. В третьей декаде мая - первой декаде июня наблюдается его обильное ежегодное цветение. У некоторых деревьев отмечается умеренное обмерзание, причиной которого является позднее окончание вегетации. Каштан конский обыкновенный дает полноценные семена высокого качества, которые созревают к октябрю. Таким образом, каштан конский можно характеризовать как перспективный вид для дальнейшей интродукции в данном регионе [80]. В городских условиях, как показывает практика, каштан конский являлся довольно

выносливым. Также рядом исследователей проводились эксперименты по интродукции каштана конского на Урале и в Западной Сибири [29, 142]. В результате был выявлен стабильный рост годичных побегов каштана конского и индивидуальная изменчивость деревьев по зимостойкости. Отмечено, что это может служить основой для селекционной работы по отбору зимостойких фенотипов в потомстве. Признано, что каштан конский является перспективным видом для целей интродукции в данном регионе [155].

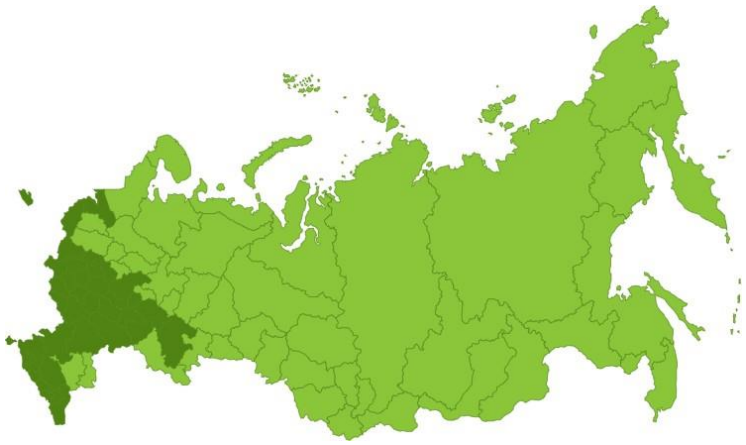


Рисунок 2 – Зона распространения каштана конского обыкновенного на территории РФ [98]

Однако следует помнить, что высокая декоративность и распространённость приводит к изменчивости морфометрических показателей вегетативных и генеративных органов каштана в различных условиях произрастания. Особенности экологических условий произрастания каштана конского в объектах озеленения приводят к значительным отличиям в количестве боковых осей в соцветии с женскими цветками и количестве женских цветков в соцветии [60]. Морфологическая вариабельность семян также достаточно высока, наблюдалось уменьшение их размеров и массы с ухудшением условий произрастания [19].

1.5. Химический состав сырья каштана конского

Согласно данным литературы, из сырья каштана конского обыкновенного выделено и идентифицировано более 200 соединений. Химический состав

данного ЛРС представлен тритерпеновыми сапонинами, кумаринами, жирными маслами, полисахаридами, аминокислотами и флавоноидами, и др. [274].

Использование каштана конского в официальной и народной медицине обусловлено содержанием в нем комплекса различных БАВ. В каждом органе растения преобладает определенная группа химических соединений. Сводные данные по накоплению БАВ различными частями каштана обобщены в Приложении 5 (Таблица 1). Структурные формулы некоторых ключевых вторичных метаболитов, накапливаемых различными частями растения представлены в Приложении 6 (Таблица 1).

Цветки каштана конского богаты веществами флавоноидной природы (кверцетин, кемпферол, рутин), содержат сапонины, дубильные вещества и полисахариды [53, 96, 140]. Ларина В.В. и соавторы в своей работе [121] приводят подбор параметров выделения индивидуальных БАВ из экстракта цветков каштана конского. Образцы были заготовлены с производящего растения на территории Калининградской области. В работе указаны оптимальные параметры экстрагирования для получения извлечений из цветов каштана конского: экстракция метанолом в среде 0,1 н трифторуксусной кислоты методом мацерации (pH=1,2). Идентификация отдельных БАВ в экстрактах осуществлялась методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по временам удерживания и спектрам индивидуальных стандартных веществ. Результаты фракционирования представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Результаты исследования фенольных соединений экстрактов цветков каштана конского, полученные методом ВЭЖХ

Растительный экстракт	Идентифицированные компоненты	Содержание, мг/кг
Цветки каштана конского	гиперозид	1,74
	кверцетин-3D-глюкозид	15,73
	астрагалин	6,15

В работе [152], Курченко В.П. и соавторы проводили анализ спиртовых экстрактов цветков каштана конского методами ВЭЖХ с масс-

спектрометрической детекцией и ГХ/МС. По данным ВЭЖХ-масс-спектрометрии исследователями было установлено, что в спиртовом экстракте содержатся преимущественно фенольные соединения, среди которых идентифицированы флавоноиды кверцетин, эпикатехин и кемпферол, а также их гликозиды, характеризующиеся типичными ионными фрагментами при ионизации электрораспылением.

В листьях и цветках конского каштана выявлен широкий спектр флавоноидов, представленных производными кверцетина и кемпферола. В листьях описаны кверцитрин, изокверцитрин, рутин, а также гликозиды кемпферола, такие как кемпферол-3-глюкозид и родственные им соединения. Цветки содержат флавоноидные гликозиды, слизь, пектины и дубильные вещества. Согласно современным исследованиям, основным методом анализа которых выступает колоночная хроматография, листья дополнительно содержат каротиноиды, такие как лютеин и виолаксантин, которые обусловливают антиоксидантную активность и фотозащитные свойства сырья. Фенольные кислоты и проантоцианидины обнаруживаются в обеих морфологических группах [134, 213].

Химическими и физико-химическими (хроматографическими) методами установлено содержание в листьях и цветках каштана конского обыкновенного органических кислот (яблочной и лимонной), ТС, конденсированных дубильных веществ, каротиноидов, хлорофилла, флавоноидов и полисахаридов. Обобщенные данные приведены в Таблице 2.

Таблица 2 – Качественный и количественный состав сырья каштана конского [146]

Сырье	Экстрагент	Метод	Содержание, %
1	2	3	4
Экстрактивные вещества			
Листья	Спирт этиловый 40%	Гравиметрия	30,1
Цветки			38,9
Органические кислоты (в пересчете на яблочную)			
Листья	Вода	Алкалиметрия	2,3±0,1
Цветки			5,0±0,1

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
Тритерпеновые сапонины			
Листья	Спирт этиловый 95%, диэтиловый эфир	Гравиметрия	2,5±0,1
Цветки			4,8±0,1
Дубильные вещества (конденсированные)			
Листья	Вода	Перманганатометрия	10,7±0,2
Цветки			7,6±0,2
Каротиноиды			
Листья	Ацетон, бензин	Спектрофотометрия (451 нм)	1,8±0,06
Цветки			0,1±0,02
Хлорофилл			
Листья	Ацетон, бензин	Спектрофотометрия (670 нм)	1,9±0,05
Флавоноиды			
Листья	Спирт этиловый 70%	Дифференциальная спектрофотометрия (410 нм, рутин)	2,3±0,05
Цветки			1,9±0,05
Полисахариды			
Листья	Вода, спирт этиловый 95%	Гравиметрия	2,1±0,1
Цветки			3,2±0,1
Пектиновые вещества			
Листья	Вода,	Гравиметрия	0,4±0,1

В процессе обзора литературы также найдено исследование элементного состава каштана конского листьев и цветков. Авторами было установлено: «изучаемые виды сырья обладают богатым макроэлементным составом, в особенности содержат значительные количества фосфора, кальция и калия, относящихся к жизненно важным элементам. Фракция микроэлементов представлена преимущественно железом, магнием, алюминием, кремнием, марганцем; в меньшей степени содержится медь, цинк, барий, стронций, бор. Подобные исследования определяют перспективность дальнейших исследований данного растительного сырья и могут предоставить интерес в области контроля экологической безопасности в различных зонах произрастания ЛРС» [193].

Анализ методом ГХ/МС выявил присутствие в экстракте высших жирных кислот и их эфиров, алифатических спиртов, 3-дезокси-d-манно-лактона, 1,2,3,5-циклогексантетрола, α-метил-маннофуранозида. Еще одним важным компонентом экстракта являлся γ-ситостерола, что дополняет характеристику липофильной фракции цветков каштана.

В статье [219] авторы впервые выделили из цветков каштана конского обыкновенного три кумарина: скополетин (7-гидрокси-6-метоксикумарин), эскулетин (6,7-дигидроксикумарин) и фраксетин (6-метокси-7,8-дигидроксикумарин). В работе использованы метод ультраэффективной жидкостной хроматографии (УЭЖХ) и препаративной ТСХ. Идентификация была подтверждена УФ-, Н-ЯМР-, С-ЯМР-спектроскопией и масс-спектрометрией с электроспрей-ионизацией.

Таким образом, конский каштан представляет собой источник комплекса ТС, кумаринов, флавоноидов, проантоцианидинов, дубильных веществ, полисахаридов и каротиноидов, что обусловливает его многофакторное фармакологическое действие и перспективность дальнейшего фармакогностического изучения.

1.6. Методы определения тритерпеновых сапонинов в сырье каштана конского

Тритерпеновые гликозиды (сапонины) представляют собой весьма распространенную группу вторичных метаболитов сложного или смешанного биогенеза. Терпеноидная часть (агликон) тритерпеновых гликозидов является метаболитом мевалоновой кислоты, а углеводные части – метаболитами глюкозы или других моносахаридов [165].

Общих химических методов определения сапонинов в растительном сырье не существует, поэтому в работе проведен обзор методов анализа ТС в цветках каштана конского. Известно, что ТС, в частности эсцин, являются целевой группой БАВ фармакопейного сырья каштана конского – семян. Следовательно, актуальным будет являться оценка их содержания и в объекте нашей работы – цветках. Для чего мы провели сравнительный анализ методов определения ТС в растительном сырье, препаратах и биологически активных добавках (БАД) на его основе.

Среди пентациклических ТС наиболее важный представитель производных олеанана (Рисунок 3) является эсцин (Рисунок 4) и его изомеры (Таблица 3), наряду с олеанановой, глицерритиновой, глицирризиновой и примуловой кислотами.

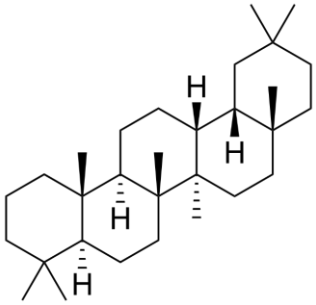


Рисунок 3 – Структура олеанана

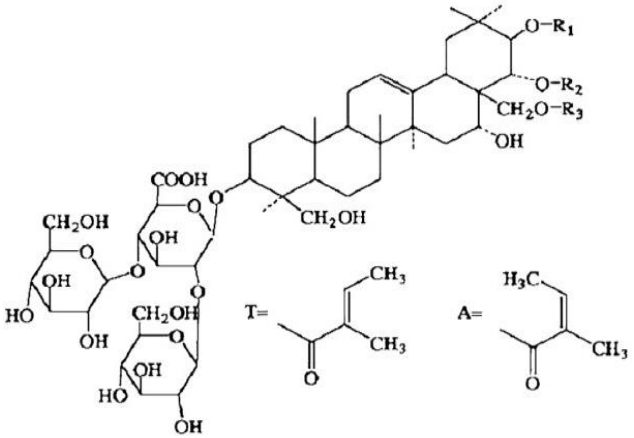


Рисунок 4 – Общая структурная формула изомеров эсцина

Таблица 3 – Строение изомеров эсцина

Изомер эсцина	R_1	R_2	R_3
Эсцин Ia	T	$-COCH_3$	-H
Эсцин Ib	A	$-COCH_3$	-H
Изоэсцин Ia	T	-H	$-COCH_3$
Изоэсцин Ib	A	-H	$-COCH_3$
Аэскулизид A	A	-H	-H
Аэскулизид B	-H	-H	-H
Эсцин IVc	-H	T	$-COCH_3$
Эсцин IIa	T	$-COCH_3$	-H
Эсцин V	$-COCH(CH_3)_2$	$-COCH_3$	-H

Выделение из сырья. Наиболее известной для выделения сапонинов из растительного сырья является схема Кочеткова-Хорлина [165] (Рисунок 5) и ее различные модификации, в которых очистка суммы ТС от сопутствующих соединений осуществляется с помощью жидко-жидкостной экстракции.

Часто в литературе применяются схемы выделения, включающие стадию очистки с применением твердо-фазной экстракции (колоночной хроматографии) [130, 166, 185-190] (Рисунок 6). Описаны схемы, позволяющие разделить выделенный комплекс сапонинов на группы по полярности (Рисунок 7).

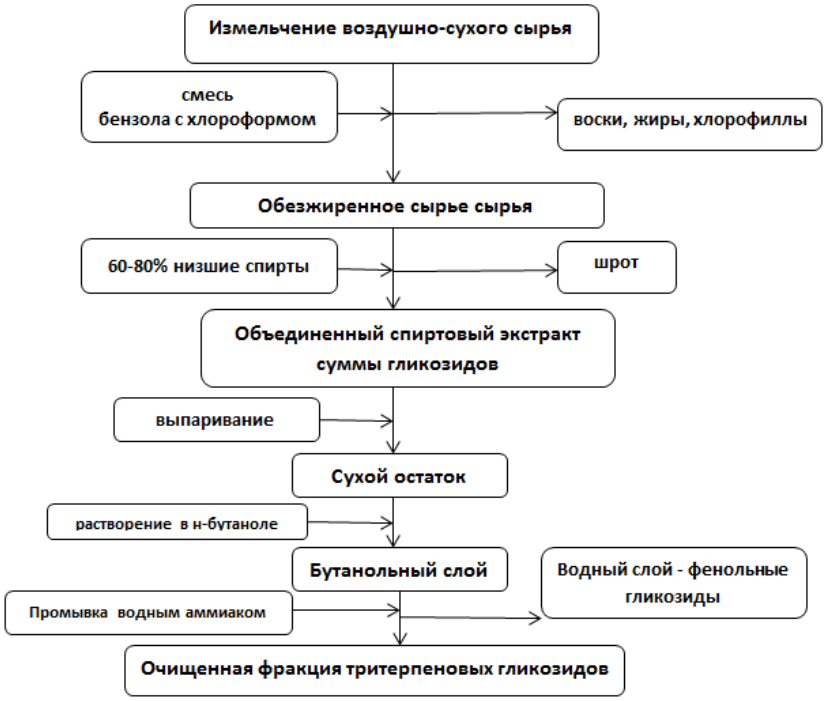


Рисунок 5 – Схема Кочеткова-Хорлина для выделения сапонинов из растительного сырья

Описано выделение индивидуальных ТС из бутанольного экстракта методом колоночной хроматографии на силикагеле (5,5×120 см), очищая от фенольных соединений. Хорошие результаты дает отделение низкомолекулярных примесей от суммы сапонинов на колонке с сефадексом G-25 в водных растворах. Также описано применение оксида алюминия нейтрального для этих целей.

Качественные реакции. Традиционно для «первичного обнаружения сапонинов в извлечениях из растительных объектов используют качественные реакции и пробы» [84]. Обобщенные сведения об основных применяемых реакциях и аналитических эффектах представлены в Приложении 7 (Таблица 1).

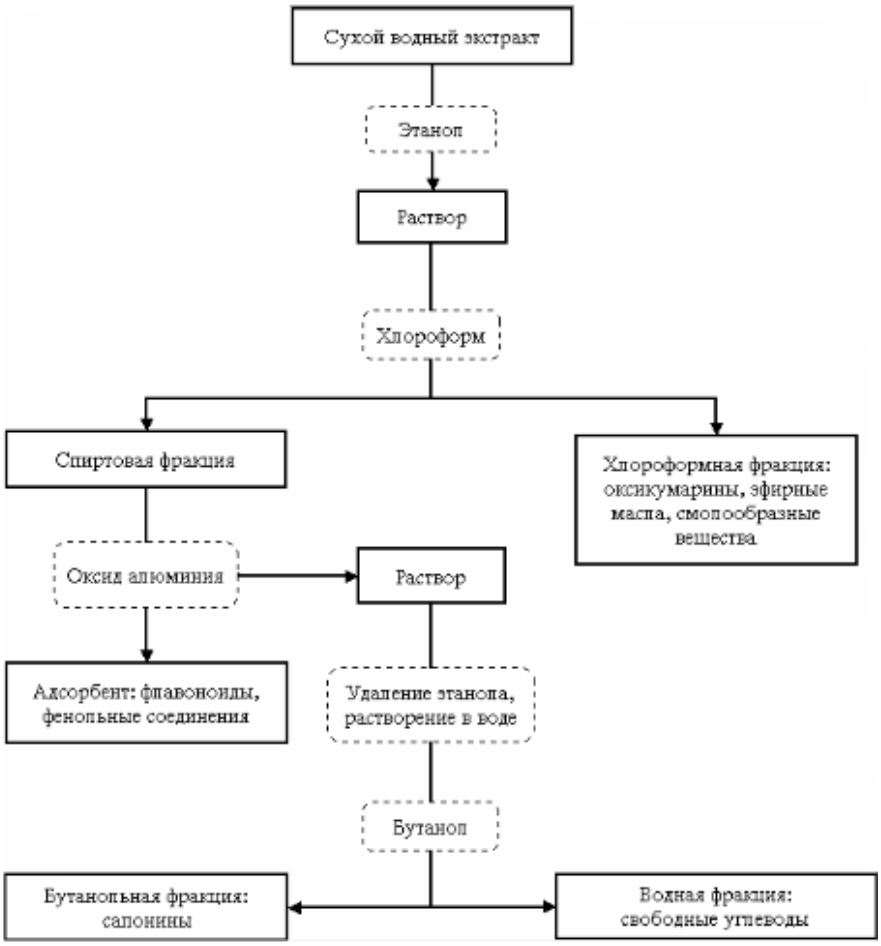


Рисунок 6 – Схема выделения суммы сапонинов [130]



Рисунок 7 – Схема разделения сапонинов [130]

В литературе не обнаружены титриметрические, электрохимические и биологические методы определения ТС в сырье каштана конского.

Методы установления структуры тритерпеновых сапонинов. Надежным и часто применяемым методом установления структуры выделенных сапонинов

из ЛРС являются методы спектроскопии, в частности, масс-спектроскопии, ИК-спектроскопии в сочетании со спектроскопией ЯМР и ПМР, позволяющих надежно идентифицировать генин полученного гликозида. В проведенном обзоре литературы не обнаружено работ, посвященных исследованию структуры ТС каштана конского данными методами.

Капиллярный зонный электрофорез. Анализ литературы показал, что определение сапонинов методом КЭ ограничено ввиду особенности их строения (высокая молекулярная масса, трудность перевода в ионогенное состояние) [250]. Не обнаружено также описание применения данного метода и для сырья каштана конского.

Спектрофотометрия. В настоящее время абсолютное большинство научных статей по спектрофотометрическому определению содержания суммы ТС посвящено «различным методикам после реакции взаимодействия с концентрированной серной кислотой. Тритерпеноиды протонируются по двойной связи с образованием карбокатиона, а при наличии карбоксильной группы при С-28 имеет место последующая лактонизация» [124, 154, 168, 177]. При этом наблюдается характерный максимум поглощения для эсцина - 328±3 нм [17, 124, 168, 170]. Расчет ведут в сравнении с достоверными стандартными образцами (СО) или по значению удельного показателя поглощения (Таблица 4).

ТС, обладая ненасыщенной связью или 3-гидрокси-и 3-карбонильной группами, могут образовывать иона карбония с видимой окраской в безводном состоянии также, легко вступая в реакцию с такими сильными кислотами, как ледяная уксусная кислота и перхлоридная кислота. Ион карбония может образовывать устойчивую видимую окраску с ванилином в результате реакции нуклеофильного присоединения, поэтому 5 % ванилин в ледяной уксусной кислоте и хлорной кислоте обычно используют в качестве красителей для определения ТС методом УФ-спектрофотометрии в видимом диапазоне 500-600 нм [154, 177].

Таблица 4 – Значения удельных показателей поглощения продуктов реакции с конц. серной кислотой эсцина и его генина, используемых для пересчета суммы

№ п/п	Тритерпеновый сапонин	Значение удельного показателей поглощения	Растворитель, длина волны
1	Эсцин	222,45	70% этанол; 328 нм
2	Эсцин	422	96% этанол; 321 нм
3	Эсцигенин	80–84	70% этанол; 280–284 нм

Зачастую при анализе фракции сапонинов в ЛРС спектрофотометрическим методом требуется проведение стадии гидролиза. Такой подход необходим для получения агликонов молекул сапонинов, поскольку именно эти формы дают наиболее объективный максимум поглощения. Это, в свою очередь, позволяет выполнить точное количественное определение указанной группы БАВ. Согласно имеющимся данным литературы, для гидролиза сапонинов наиболее часто авторы используют смесь для гидролиза – Килиани (ледяная уксусная кислота – хлористоводородная кислота – вода 3,5:1:5,5) при времени кипячения 2 часа [5, 30, 70, 134, 144, 145, 182, 184]. При анализе литературы по теме исследования отмечена работа, где авторы для гидролиза применили смесь 3 частей серной кислоты конц. и 4 частей кислоты уксусной ледяной [90].

Широкому внедрению данного метода для анализа ТС в растительном сырье мешают сопутствующие соединения, поглощающие в области, близкой к аналитической длине волны поглощения продуктов взаимодействия сапонинов с конц. серной кислотой или другими цветореагентами. Для очистки от неполярных балластных веществ применяют предварительную экстракцию хлороформом, от полярных — твердофазную экстракцию с использованием сорбента различных типов [86]. После получения экстракта из растительного сырья, многие авторы проводят хроматографическую очистку полученного извлечения с помощью колоночной хроматографии или фильтрацией через слой силикагеля на стеклянном фильтре. Также применяются методы жидкость-жидкостной экстракции с различными органическими растворителями.

Обобщенные данные из открытых литературных источников: «об условиях спектрофотометрического количественного определения сапонинов в пересчете на эсцин в растительном сырье, основанное на реакции с концентрированной серной кислотой приведены в Приложении 8 (Таблица 1). Известны также и другие способы определения сапонинов (в т.ч. в сырье каштана конского), методом колориметрии с использованием различных хромогенных реактивов, они отражены в Приложении 8» [26, 154] (Таблица 2).

Спектрофотометрия в ультрафиолетовом диапазоне может использоваться только для определения общего количества ТС из-за неустойчивости во времени образующихся окрашенных соединений, Воспроизводимость перечисленных спектрофотометрических методик в условиях лаборатории крайне низка, характеризуется недостаточной разрешающей способностью и специфичностью, что обусловлено несколькими факторами: во-первых, измерение оптической плотности окрашенных комплексов гликозидов сапонинов подразумевает отсутствие взаимодействия серной кислоты с остальными компонентами раствора. В большинстве вытяжек из растительного материала помимо целевых компонентов содержатся побочные соединения, способные взаимодействовать с образованием окраски, что значительно увеличивает ошибку анализа; во-вторых, прямое измерение оптической плотности растворов гликозидов сопряжено с рядом трудностей, обусловленных идентификацией пиков [118].

Хроматографические методы. ГЖХ-анализ сапонинов крайне редко описан для определения данной группы БАВ в ЛРС, что объясняется особенностями структуры (малолетучие и термолабильные гликозиды, трудно переводимые в подходящие летучие производные).

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Среди хроматографических методов определения ВЭЖХ является наиболее мощным и часто применяемым методом для определения сапонинов с ЛРС как в форме агликонов, так сапогенинов. Разделение обычно проводят на нормально-фазовых (силикагелевых) и обращенно-фазовых (C_8 C_{18}) колонках, из которых предпочтение отдается C_{18} (Таблица 5). Перед анализом рекомендуется проводить

твердофазную очистку извлечений. Все углеводы и большинство фенольных соединений могут быть удалены из матрицы путем тщательного подбора элюента, обычно смеси метанола и воды. ВЭЖХ в ультраэффективном ее варианте в сочетании с масс-спектрометрией обладает большими преимуществами по сравнению с другими способами детектирования с точки зрения селективности, чувствительности и разрешения. ВЭЖХ-масс-спектрометрия дает возможность получить более богатую информацию о массе для определения типа и последовательности мономеров в сахаридной цепи агликона ТС.

Таблица 5 – Условия для определения тритерпеновых сапонинов семян конского каштана обыкновенного и некоторых лекарственных препаратов, содержащих эсцин методом ВЭЖХ [1]

Прибор	Колонки	Элюенты	Детектор	Разделенные компоненты
Shimadzu Prominence LC-20AD с дегазатором DGU-20A3R и УФ-детектором Shimadzu SPD-20A	Nova-Pak C18, размером 250 x4,6 мм, размер частиц 4 мкм	Режим элюирования градиентный Подвижная фаза А. Раствор ортофосфорной кислоты pH 3,5. Подвижная фаза Б. Ацетонитрил	Спектрофотометрический, 210 нм	β-эсцин

В работе [202] изучен эсцинат натрия, получаемый из сапонинов семян конского каштана китайского методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии. В эсцинате натрия, помимо эсцина I a, эсцина I b, изоэсцина I a, изоэсцина I b, аэскулизида A, аэскулизида B, аэскулизида A, эсцина IVc, эсцина IIa и эсцина V, было обнаружено 19 сапониновых соединений. Исследование показало, что сапогенины в эсцинате натрия имеют два структурных типа: протоэсцигенин и баррингенол C, а заместитель ацетил, тиглоил или ангелоил обычно находится в положении C-21, C-22 или C-28. У всех этих выявленных сапонинов сахарные цепи, состоящие из глюкозы и глюкуронида, расположены в положении C-3. Зарубежными учеными [217] также разделены и количественно определены четыре основных сапонина (эсцин Ia, эсцин Ib, изоэсцин Ia и изоэсцин Ib) в экстрактах кожуры и эндосперма семян конского каштана (*Aesculus hippocastanum* L.) методом ВЭЖХ с диодной

матрицей на колонке Zorbax SB-ODS-(150 мм × 2,1 мм, 3 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил и 0,10% раствор фосфорной кислоты (39:61 об./об.), скорость потока – 0,5 мл/мин при детектировании при 210 нм и 230 нм. Установлено, что содержание эсцинов в семенах снизилось более чем на 30% в эндосперме и более чем на 40% в кожуре после двух лет хранения.

Новый метод, основанный на ускоренной экстракции растворителем, с последующим ВЭЖХ с диодно-матричной детекцией и электрораспылительной масс-спектрометрией с положительными ионами (ESI-TOF/MS), был разработан для количественного определения четырех основных сапонинов в экстрактах семян *Aesculus chinensis* Bunge. Условия ВЭЖХ следующие: колонка SinoChrom ODS BP C18 (4,6 мм x 200 мм, 5 мкм), 0,10% раствор ортофосфорной кислоты и ацетонитрил в качестве подвижной фазы, скорость потока 1,0 мл мин($^{-1}$), длина детектирования УФ 203 нм, объем инъекции 10 мкл [218].

Тонкослойная хроматография. Одним из наиболее экспрессных и эффективных методов качественного определения был и остается метод ТСХ. Обобщенные данные представленных в литературе методик ТСХ-разделения сапонинов сырья каштана конского приведены в Приложении 8 (Таблица 3).

Количественная тонкослойная хроматография. Имеются многочисленные работы, посвященные разработке методик идентификации и количественного определения ТС в растительных объектах методом ТСХ. Так для травы гиностеммы пятилистной [18, 119] описана хроматоденситометрическая методика количественного определения β-эсцина.

Разработан достаточно простой и быстрый ТСХ-денситометрический метод идентификации α-эсцина в коммерческих образцах, которые представляли собой ЛФ для приема внутрь (таблетки), а также в форме геля, содержащего 20 мг α-эсцина. При этом наилучшие результаты в ТСХ-денситометрическом исследовании α-эсцина были получены при использовании подвижной фазы БУВ (30:7:13), использовании пластин из силикагеля 60 F^{254} с зоной концентрирования и последующем нанесении 10% серной кислоты в этаноле или 5% ванилина в метаноле/серной кислоте соответственно [266].

Предложен метод денситометрического высокоэффективного ТСХ-определения α-эсцина в лекарственном растительном препарате, содержащем два сухих экстракта в капсулах (250 мг сухого экстракта *Aesculus hippocastanum* и 120 мг сухого экстракта *Vitis vinifera*), включающий стадию предварительной очистки с применением твердофазной экстракции (ТФЭ-C_{18}), разделение в верхнем слое смеси БУВ (50:10:40), проявлении зон раствором анисового альдегида и измерении при длине волны 535 нм [216, 258].

Разработан также метод количественного высокоэффективного ТСХ-определения эсцина в фармацевтических препаратах с денситометрическим анализом (при 212 нм, что соответствует λ_{max} эсцина, полученному методом сканирования *in situ*) на пластинах высокоэффективной ТСХ с силикагелем при элюировании смесью пропионата, этилацетата и воды (3,5:4,5:2) [214]. ТС спиртовых экстрактов из *Aesculus hippocastanum* в работе [231] разделяли на кремниевых пластинах (Sil G-50 UV 254 (Macherey-Nagel), 10 х 20 см) с использованием автоматизированной градиентной ТСХ (AMD-TLC). AMD достигалось в 25 стадий с использованием метанола, этилацетата, толуола, 1,2-дихлорэтана, 25% раствора аммиака и безводной муравьиной кислоты в качестве модификаторов. Хроматограммы анализировали с помощью двухволнового сканера Shimadzu CS-9000. В работе [268] представлено количественное определение методом ТСХ-денситометрии БАВ сухих экстрактов *Aesculus hippocastanum* (эсцин).

Таким образом, проведенный анализ используемых методов для определения ТС, позволил установить, что наиболее широко используются спектральные и хроматографические. ТСХ с нормальной и обращённой фазами (ТСХ, высокоэффективной ТСХ, двумерная ТСХ) обеспечивает превосходную качественную информацию и в сочетании с денситометрической оценкой может использоваться для рутинного определения сапонинов в растительном материале. Однако, денситометрия сапонинов очень чувствительна к качеству пластины, технике распыления и времени нагревания, поэтому параллельно с образцом необходимо проводить анализ соответствующих стандартов сапонинов. ГЖХ

имеет ограниченное применение для определения, поскольку сапонины представляют собой довольно крупные молекулы и нелетучие соединения. Этот метод использовался для определения триметилсилил-, ацетильных или метильных производных агликонов, высвобождаемых при гидролизе сапонинов. Однако, структурно различные сапонины демонстрируют разную скорость гидролиза, поэтому точная оптимизация условий гидролиза крайне важна. Кроме того, в процессе гидролиза может образовываться ряд артефактов, которые могут влиять на конечные результаты. ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой остается наилучшим методом определения сапонинов и является наиболее широко используемым для этой группы соединений. Однако, отсутствие хромофоров, позволяющих проводить детектирование в УФ-диапазоне, ограничивает выбор градиента и метода детектирования. Предколоночная дериватизация с бензоилхлоридом, кумарином или 4-бромфенацилбромидом успешно применялась в некоторых случаях, позволяя проводить УФ-детектирование разделения. Стандартизация и идентификация пиков на ВЭЖХ-хроматограммах основывались на сравнении времен удерживания с наблюдаемыми для аутентичных стандартов. Однако новые комбинированные методы, сочетающие ВЭЖХ с масс-спектрометрией и ядерным магнитным резонансом, быстро развиваются и позволяют идентифицировать разделенные сапонины в режиме реального времени.

Согласно ФС «Каштана конского семена» ГФ РФ XV издания [26] качественная идентификация осуществляется методом ТСХ по определению эсцина. Фармакопейный метод количественного определения ТС в пересчете на эсцин основан на фотометрировании окрашенных продуктов цветной реакции с окислителем. Данная методика характеризуется длительностью, трудоемкостью и, как правило, требуют предварительной очистки анализируемых извлечений от сопутствующей матрицы и, как правило, дают завышенные результаты по сравнению с современными вариантами колоночной хроматографии. За рубежом в настоящее время в анализе ТС сырья каштана конского предпочтение отдается градиентной ВЭЖХ на колонках с обращенной фазой в сочетании с масс-

спектрометрией и ядерным магнитным резонансом, позволяя разделить и идентифицировать более 20 производных сапонины в режиме реального времени.

1.7. Сравнительный анализ требований национальных фармакопей к качеству сырья каштана конского

Опираясь на обзорную статью Фроловой Л.Н. и соавторов [213], посвящённую сравнительному анализу методов стандартизации ТС, включенных в Российскую и другие фармакопеи, можно отметить, что семена конского каштана длительное время не были включены в отечественную фармакопейную нормативную базу в качестве самостоятельного вида сырья. Анализируя архивные издания Государственной фармакопеи СССР и РФ авторы установили, что в изданиях I–XIII отдельная статья на данное сырье отсутствовала. Определённые требования к качеству начали формироваться позднее, в том числе через отраслевые технические условия, что стало переходным этапом к фармакопейной регламентации.

Ситуация изменилась с выходом Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания, где, хотя и не была введена статья непосредственно на сырьё, появился регламент на гомеопатическую матричную настойку конского каштана. В нём были приведены методы идентификации и количественного определения β-эсцина с использованием методов ТСХ и ВЭЖХ. Полноценная фармакопейная статья на семена каштана конского ФС.2.5.0117. «Конского каштана обыкновенного семена», где идентификация проводится с помощью ТСХ по β-эсцину, а количественное определение ТС в пересчёте на эсцин (не менее 3%) выполняется методом спектрофотометрии была утверждена лишь в ГФ РФ XV издания, что ознаменовало завершение процесса официальной стандартизации семян каштана конского в РФ. Также в ГФ РФ XV издания представлена НД на «Сухой экстракт семян каштана конского».

Британская, Немецкая и Французская фармакопеи содержат согласованные с Европейской фармакопеей НД на семена каштана конского, где идентификация проводится с помощью ТСХ, а количественное определение ТС выполняется методом ВЭЖХ. Однако расчет содержания ведется не на эсцин, а на

протоэсцигенин (не менее 1,5%). Это отличает европейский подход от российского, где СО служит эсцин. Французская фармакопея также включает НД на кору каштана конского.

Фармакопея США содержит статью на семена каштана конского, где стандартизация осуществляется на основе макро- и микроскопического анализа, идентификации БАВ методом ТСХ и количественного анализа спектрофотометрическим методом при длине волны 540 нм, с расчетом суммы тритерпеновых гликозидов в пересчете на эсцин (не менее 3,0%). Дополнительно нормируется содержание экстрактивных веществ.

Китайская фармакопея отличается тем, что допускает использование семян нескольких видов рода *Aesculus*, а именно *Aesculus chinensis* Bge., *Aesculus chinensis var. chekiangensis* (Hu & W.P.Fang) W.P.Fang., *Aesculus wilsonii* Rehd. В ней также регламентируется использование ВЭЖХ для количественного определения ТС (содержание эсцина – не менее 2,0%) [11, 213].

Японская фармакопея предписывает проведение ВЭЖХ-анализа с минимальным допустимым содержанием эсцина 1,5%, а также включает норматив по экстрактивным веществам.

Таким образом, зарубежные фармакопеи демонстрируют общую тенденцию к использованию хроматографических методов для оценки подлинности и количественного анализа сырья, но варьируют в выборе СО для пересчета (эсцин или протоэсцигенин) и нормативах содержания. Это отражает различные научно-методологические традиции и подходы к оценке качества данного вида ЛРС.

1.8. Заготовка сырья

В литературе представлена информация о рекомендациях по заготовке сырья различных морфологических групп каштана конского. Обобщенные сведения приведены в Таблице 6.

Исходя из теоретических положений: «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%. Сырье упаковывают в мешки по 20-30 кг и хранят 2 года» [11].

Некоторые авторы утверждают, что заготовку листьев следует проводить осенью в фазу плодоношения и увядания растения, так как в этот период фиксируется наивысший уровень накопления БАВ в сырье [6, 127].

Таблица 6 – Данные о правилах заготовки сырья каштана конского различных морфологических групп

Период заготовки	Собираемая часть растения	Способ сушки
Семена [11, 157]		
После полного созревания и осыпания в сентябре-октябре	Очищают от околоплодника	Естественная сушка - сырье на стеллажах слоями толщиной 5 см (сушка длится от 3 до 4 недель). Сушка в сушилках с температурой 50-60 °С - три дня
Кора [85, 98]		
Во время сокодвижения ранней весной (март-апрель)	Кора с молодых ветвей дерева толщиной не более 2-3 мм	Естественная - на стеллажах в хорошо проветриваемом сухом помещении или на открытом воздухе
Листья [11, 78, 128, 157]		
В вегетационный период – с мая по сентябрь	Собираются вместе с черешками	В сушилках, под навесами или в хорошо проветриваемых помещениях, выкладывая слоем толщиной не более 10 см. В первые 2-3 дня для ускорения сушки листья периодически переворачивают
Цветки [26, 33, 98, 176]		
В начале цветения	Обрывают с оси соцветия (тирса)	Воздушно-теневая сушка на открытом воздухе под навесами или в хорошо проветриваемом помещении

Следует отметить, что начало цветения каштана в различных регионах РФ с разнящимся климатическим поясом достаточно вариабельно. На широте Воронежской области этот период приходится на май (Таблица 7).

Таблица 7 – Фенологическая карта цветения конского каштана различных регионов произрастания

№	Регион РФ	Начало цветения	Период цветения
	1	2	3
1	Петрозаводский городской округ	конец мая-начало июня	май-июнь
2	Ленинградская область	середина-конец мая	май-июнь
3	Московская область	начало-середина мая	май-июнь
4	Воронежская область	начало мая	май-июнь

Продолжение таблицы7

5	1	2	3
	Волгоградская область	конец апреля-начало мая	апрель-май
6	Ставропольский край	конец апреля-начало мая	апрель-май

1.9. Фармакологические свойства сырья каштана конского

О возможности использования каштана конского в научно-практической медицине стало известно в конце XIX века, были опубликованы первые работы, посвященные успешной терапии настойкой каштана геморроя, а также варикозных проявлений. «Обширное производство флеботоников в промышленных масштабах на основе каштана конского датируется серединой XX века и началось оно в Германии» [11, 43].

Область применения практически всех составляющих растения (цветки, листья, плоды, кора) в народной медицине достаточно широка, благодаря разнообразному составу БАВ (Таблица 8). В официнальной же медицине на данный момент используют семена каштана.

Экстракт семян конского каштана и препараты на его основе на протяжении более двух веков успешно используют в клинической практике для лечения хронического геморроя, посттравматических и постоперационных отеков, а также хронического заболевания вен (ХЗВ) нижних конечностей.

Во многом это доказывают и различные современные клинические исследования экстракта конского каштана. Так, авторы Кокрейновского систематического обзора с метаанализом данных Phlebotonics for venous insufficiency пришли к заключению, что экстракт конского каштана является эффективным и безопасным при краткосрочным лечении ХЗВ. В 6 из 7 взятых в обзор исследований сообщалось о значительном сокращении боли в ногах в группах, применявших экстракт конского каштана по сравнению с группами плацебо. Помимо значительного терапевтического потенциала экстракт семян конского каштана продемонстрировал высокий профиль безопасности, благодаря чему был включен в линейку современных флебопротекторов [169, 222, 255].

Таблица 8 – Область применения каштана конского [81, 150]

Части растения	Применение в народной медицине
Отвар коры дерева	В виде сидячих ванн при геморрое и варикозном расширении вен. Внутрь – при маточных и геморроидальных
Настой листьев	Отхаркивающее средство
Настой листьев и цветков	При лечении гипертонической болезни, ипохондрии, истерии, холециститов (как гипотензивное и успокаивающее средства)
Кора ветвей, плоды, цветки в виде отваров и настоев	При лечении геморроя, варикозного расширения вен голени
Настой цветков	При заболеваниях желчного пузыря, как успокаивающее, снижающее артериальное давление средство
Сок свежих цветков	При туберкулезе, ревматизме, ишиасе
Порошок плодов	Кровоостанавливающее средство
Настой и отвар семян	Венотоническое средство

Однопроцентная гелевая композиция на основе экстракта оболочек плодов конского каштана демонстрировала выраженную противовоспалительную эффективность. В ходе экспериментальных исследований была установлена её антиэкссудативная активность на уровне 84%, что сопоставимо с показателями мази «Преднизолон» и превышает аналогичные параметры для препаратов «Левомеколь» и «Солкосерил» [12, 129]. Современные данные свидетельствуют, что гликозиды каштана, в частности эскулин, способствуют повышению резистентности сосудистой стенки капилляров и снижению показателей вязкости крови. Одним из пероральных флеботропных лекарственных препаратов, имеющих доказанную эффективность в отношении веноспецифических симптомов начальных форм ХЗВ, является «Эскузан». К активным действующим веществам препарата относятся экстракт семян конского каштана и тиамин. В состав экстракта семян конского каштана входит несколько БАВ в т.ч. сапонины и флавоноиды [13, 20, 32, 82]. Сапонины, в частности β-эсцин, обусловливают основной флебопротективный эффект препарата, который потенцируют другие биофлавоноиды – кверцетин, кемпферол и их производные. Эсцин предупреждает образование тромбов в мелких кровеносных сосудах, положительно влияет на кровообращение, улучшает снабжение тканей кислородом и защищает от повреждений эндотелий сосудов. Благодаря способности эсцина увеличивать содержание в стенках сосудов простагландинов F-2 достигается репарирующий и

протекторный эффект препарата. Прием эсцина существенно понижает выход электролитов, низкомолекулярных соединений и воды в межклеточное пространство. Усиление синтеза и повышение высвобождения простагландинов оказывает некоторое антиэкссудативное действие. В качестве антигипоксанта выступает проантоцианидин А2, а кумарины (эскулин, фраксин) оказывают умеренное гипокоагулирующее действие [105]. Препарат оказывает комплексное противоотечное, противовоспалительное и флеботонизирующее действие, реализующееся через различные молекулярно-клеточные механизмы, часть из которых уже хорошо изучена. В частности, повышение тонуса и сократительной активности венозной стенки связывают с улучшением избирательной проницаемости медленных кальциевых каналов миоцитов, что в качестве клинического исхода выражается в уменьшении выраженности веноспецифических симптомов и отека. Метаанализ рандомизированных плацебо-контролируемых клинических исследований продемонстрировал хорошую переносимость пероральных форм экстракта конского каштана с отсутствием тяжелых нежелательных явлений. Как известно, препараты на основе каштана конского используют и для лечения геморроя [15]. На основании клинического и эндоскопического обследования было показано, что прием Эскузана по 40 мг 3 раза в сутки на протяжении 2 месяцев значимо превосходил плацебо в отношении снижения степени выраженности болевого синдрома, уменьшения кровоточивости и перианального отека. Улучшение клинической симптоматики происходило в среднем через 6 дней терапии, а эндоскопические признаки улучшались спустя 2 недели [203, 234, 256].

Экстракт семян конского каштана в эксперименте усиливал кальций-зависимое сокращение гладкомышечных волокон венозной стенки, но при этом угнетал действие α-адренергического агониста – фенилэфрина, вызывающего сужение артериол, повышение АД (с возможной рефлекторной брадикардией) и повышение общего периферического сопротивления сосудов [14, 206].

Согласно литературным данным, совместное применение эсцина с дексаметазоном позволяет снизить терапевтическую дозу глюкокортикоида без

ущерба для клинического эффекта. Данная комбинация проявила значительную активность в отношении ревматоидного воспаления. Важным аспектом является потенциальная возможность уменьшения характерных нежелательных явлений, ассоциированных с монотерапией дексаметазоном, при использовании подобного синергического подхода [249].

В продолжение анализа фармакологического потенциала сапонинов конского каштана следует отметить, что β-эсцин, а также стандартизированный экстракт семян Aesculus hippocastanum рассматриваются как перспективные агенты с комплексным противовирусным, вирулицидным и иммунорегулирующим действием. Их активность демонстрирует широкий спектр в отношении ряда респираторных вирусов, включая коронавирусы. Экспериментальные данные подтверждают способность данных субстанций проявлять вирулицидные и ингибирующие свойства в отношении оболочечных вирусов, таких как вирус простого герпеса 1-го типа, везикулярного стоматита и вируса денге, в условиях in vitro. Важным аспектом механизма действия является их модулирующее влияние на продукцию цитокинов, причем характер этой модуляции является строго зависимым как от природы провоспалительного стимула, так и от типа клеток-мишеней [195, 198, 246, 275].

Экспериментальные исследования на животных моделях подтверждают ранозаживляющие свойства экстракта конского каштана. Установлено, что его применение приводит к статистически значимому увеличению прочности кожных ран на растяжение, что коррелирует с улучшенной гистологической организацией коллагеновых волокон в формирующейся рубцовой ткани. Отдельные работы, посвящённые изучению заживления ран в условиях экспериментального диабета, демонстрируют способность гидроэтанольного экстракта ускорять репаративные процессы. Предполагаемый механизм этого эффекта связан с модуляцией активности ключевых металлопротеиназ матрикса, в частности ММР-1 и ММР-9, играющих центральную роль в ремоделировании внеклеточного матрикса. Кроме того, выраженные противовоспалительные свойства эсцина обосновывают рассмотрение его в качестве потенциального терапевтического агента для

патогенетически обоснованного лечения хронических воспалительных дерматозов, таких как атопический дерматит [197, 199, 221, 227].

Согласно литературным данным: «на основе комбинации стандартизированных экстрактов семян конского каштана и листьев гинкго билоба в настоящее время разработан препарат «Гинговен», применяемый в комплексной терапии хронической венозной недостаточности и варикозного расширения вен. Способность β-эсцина, выявленная при опытах *in vivo*, повышать тонус вен и купировать венозный застой служит базисом его терапевтического действия. Систематический обзор плацебо-контролируемых рандомизированных испытаний предоставил доказательства клинической эффективности данного соединения при симптомах хронической венозной недостаточности. Помимо венотонизирующего действия, важным компонентом фармакологического профиля является антитромботическая активность, обусловленная наличием в составе экстракта помолиевой кислоты. Установлено, что данное соединение способно ингибировать агрегацию тромбоцитов посредством модуляции активности пуринергических рецепторов на их мембране» [57, 72, 192, 242, 245, 257, 273].

Полисахариды оболочек семян каштана конского также потенциально оказывают гепатопротективное воздействие [81, 171].

Как показывает практика патогенетической терапии сосудистых нарушений различного генеза особый интерес вызывают препараты, обладающие комплексным действием на различные звенья сосудистых нарушений. К числу таких средств относится также ЛП «АнгиоНорм» Он представляет собой сухой экстракт, получаемый из смеси ЛРС — семян каштана конского, корней солодки, плодов боярышника и плодов шиповника. Клинические исследования продемонстрировали хорошую эффективность, безопасность и переносимость терапии у пациентов с различными нарушениями сосудистого и микроциркуляторного русла (хроническая венозная недостаточность, гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, нарушения мозгового

кровообращения, геморрой, трофические язвы на фоне варикозно-расширенных вен, постинфарктные состояния, лимфостаз верхней конечности) [151].

В настоящее время также исследуется роль β-эсцина как биосурфактанта. β-эсцин используется в фармакологических и косметических целях, проявляя сильную поверхностную активность. Взаимодействие β-эсцина с фосфолипидными модельными мембранами и образование бицелл при высокой концентрации β-эсцина заключает в себе потенциал использования данной молекулы для определения структуры мембранных белков методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Кроме того изучено взаимодействие β-эсцина с такими мембранными добавками как холестерин и ибупрофен. Эти исследования позволяют обеспечить нас фундаментальными знаниями и помогают лучше понять влияние β-эсцина на организм человека [228].

Также есть сведения о том, что основные группы БАВ каштана конского обладают выраженной цитостатической активностью, в то время как его вторичные метаболиты могут оказывать цитопротекторное действие. Кроме этого, было обнаружено, что эсцин конского каштана демонстрирует способность потенцировать цитостатический эффект гемцитабина в отношении аденокарциномы поджелудочной железы, что указывает на его перспективность в качестве адъювантного агента в химиотерапии. In vitro исследования подтверждают дозозависимое снижение жизнеспособности различных линий злокачественных клеток под действием эсцина уже в течение 24 часов воздействия. Установленный механизм противоопухолевого действия включает индукцию апоптоза через инактивацию антиапоптотического сигнального пути Bcl-2, а также через генерацию активных форм кислорода, ведущую к характерным морфологическим и ультраструктурным изменениям в клетках. Отдельные исследования на модели остеосаркомы показывают, что эсцин способен одновременно индуцировать как апоптоз, так и аутофагию посредством активации ROS/p38 MAPK сигнального каскада [201, 211, 215, 224, 226, 231, 238, 269].

Также эсцин, вероятно, способствует предотвращению негативных последствий стрептозотоцин-индуцированной диабетической нефропатии. Этот эффект реализуется через снижение содержания фибронектина в клубочковой зоне, уменьшение иммунной экспрессии, а также через понижение уровня креатинина и улучшение функционального состояния почек. также у молекулы эсцина была обнаружена гепатопротекторная, гастростропротекторная и нейропротекторная активность. Установлено, что экстракт семян каштана конского обладает антибактериальной активность в отношении *S. aureus*, *E. coli*, *S. mutans*. Область медицинского применения каштана конского может быть расширена благодаря доклиническим исследованиям, посвященным оценке влияния экстракта листьев каштана конского на парадонтит. Исследования проводили на собаках породы бигль и результаты показали, что экстракт листьев каштана конского будет эффективен при пародонтите благодаря своей способности подавлять активность желатиназы и коллагеназы при воспалении [204, 225, 237, 239, 244, 247].

Исследователи из Варшавского университета естественных наук изучили цветки и листья конского каштана обыкновенного и конского каштана красного и пришли к следующему выводу: «Благодаря богатому составу биологически активных соединений (БАС) (каротиноиды, хлорофиллы и полифенолы) цветки и листья конского каштана и красного конского каштана конского обладали высокой биологической ценностью в качестве пищевых добавок с сильной антиоксидантной активностью» [261].

Группой исследователей из Республики Беларусь [152] была проведена оценка антиоксидантной активности и токсиколого-гигиенических характеристик спиртового экстракта цветков каштана конского. Антиоксидантную активность авторы определяли по кривым зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации экстракта рассчитывали показатель IC50, соответствующий 50% ингибированию свободных радикалов. Ученые установили, что для экстракта цветков каштана конского значение IC50 составило 5,3·10-5% разведения исходного экстракта, что свидетельствует о его высокой

антиоксидантной активности, сопоставимой с экстрактами других лекарственных растений. Авторы объясняют выявленное свойство цветков конского каштана их высоким содержанием флавоноидов и других вторичных метаболитов.

Первичная токсиколого-гигиеническая оценка, проведенная исследователями, на тест-объекте Tetrahymena pyriformis в моделях острой и подострой токсичности показала, что ЛД50 в остром опыте не превышает 26,9±0,6 мг/мл, а в подостром – 23,6±0,1 мг/мл, на основании чего спиртовой экстракт цветков каштана конского отнесён авторами к 4 классу опасности и был характеризован как малоопасное вещество.

Таким образом, в последние десятилетия проведены многочисленные исследования in vitro и in vivo, которые убедительно доказывают, что ТС способны в широчайшем спектре оказывать фармакологическое действие: противовоспалительное, гиполипидимическое, регулирующее водно-солевой обмен, отхаркивающее, мочегонное, тонизирующее, адаптогенное, антиаллергическое, седативное, антимикробное и антифунгинальное [179].

1.10. Маркетинговое исследование рынка лекарственных препаратов на основе сырья каштана конского

Нами проведено исследование фармацевтического рынка РФ с целью анализа ассортимента препаратов на основе растительного сырья каштана конского, а также обоснования перспективности изучения нефармакопейных частей лекарственного растения для дальнейшего создания эффективных и безопасных лекарственных средств отечественного производства [101]. Информационную базу исследования составили данные Государственного реестра лекарственных средств (по состоянию на 17.05.2026 года), интернет-ресурсов Видаль и РЛС. Анализ Государственного реестра лекарственных средств показал, что в гражданском обращении в РФ зарегистрировано 4 наименования ЛП на основе семян каштана конского венотонизирующего действия и 2 ЛП иных фармакологических групп (Таблица 9). Доля зарубежных и отечественных производителей венотоников на основе семян является паритетной. Однако, в

общей структуре производителей препаратов на основе семян конского каштана доля отечественных ЛП является преобладающей и составляет 67%.

Таблица 9 – Зарегистрированные ЛП на основе сырья каштана конского

№ п/п	Торговое наименование	Форма выпуска	Страна производитель	Фармакологическая группа
1	Ангионорм	таблетки, покрытые оболочкой	Россия	Ангиопротекторы и корректоры микроциркуляции
2	Веноплант	таблетки пролонгированного действия, покрытые пленочной оболочкой	Германия	
3	Конского каштана экстракт жидкий	экстракт для приема внутрь	Россия	
4	Эскузан	капли для приема внутрь	Германия	Ангиопротекторы и корректоры микроциркуляции в комбинациях
5	РектАктив	суппозитории ректальные	Россия	Слабительные средства
6	Эвалар	эликсир	Россия	Общетонизирующие средства и адаптогены

Ассортимент зарегистрированных препаратов, в состав которых входит каштан конский, представлен различными ЛФ, преимущественно это таблетки (доля данных ЛФ составляет 33,33%). В меньшей степени представлены: экстракт для приёма внутрь, капли для приема внутрь, эликсир и суппозитории ректальные — по 1 ЛФ (16,67%) (Рисунок 8).

В качестве объекта сопоставления выступали данные комплексного обзора рынка венотоников Украины за 2024 год [88]. Согласно результатам зарубежных исследований, среди 35 зарегистрированных в Украине венотоников препараты на основе эсцина и его комбинаций составляют 17,14%, а наибольшая доля рынка приходится на препараты биофлавоноиды – 22,85%. На российском рынке, по данным маркетинговых исследований [31, 79], в структуре продаж венотоников доминируют системные препараты на основе диосмина и его комбинации с гесперидином, при этом препараты на основе каштана конского представлены относительно узким ассортиментом и не входят в число лидеров. Таким образом,

прослеживается корреляция между структурами рынков (на примере РФ и Украины). В обеих странах венотонический сегмент формируется в основном флавоноидсодержащими препаратами, тогда как доля эсцинсодержащих средств, в том числе препаратов на основе сырья каштана конского, остается ограниченной. На фармацевтическом рынке обеих стран преобладают мягкие лекарственные формы для наружного применения и твердые лекарственные формы, представленные таблетками и капсулами.

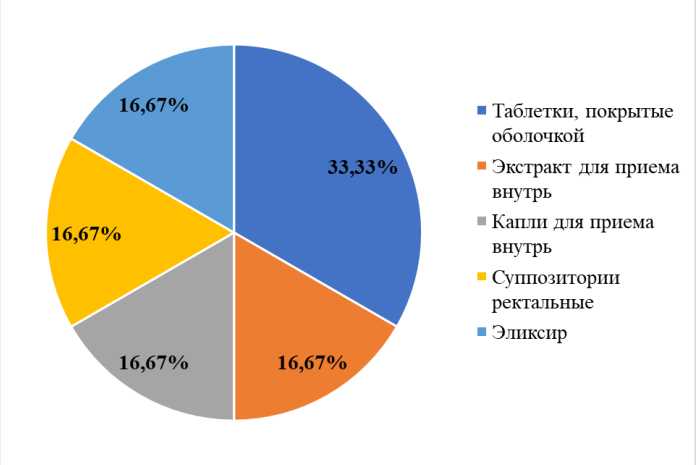


Рисунок 8 – Соотношение зарегистрированных ЛП на основе каштана конского по лекарственным формам

В отличие от российского рынка венотоников, где доминируют зарубежные производители на украинском рынке преобладают отечественные препараты (более 50%) [91, 99]. Это позволяет прогнозировать маркетинговую перспективу фитопрепаратов из цветков каштана конского для российского рынка. Они органично вписываются в уже сложившийся профиль спроса, препаратов, содержащих биофлавоноиды, но при этом занимают слабо насыщенную нишу эсцинсодержащих венотоников, что подтверждается данными о малом числе наименований и нестабильном спросе на препараты на основе каштана конского в РФ [4].

В СССР, согласно литературным данным, испытывался и впоследствии производился, как средство при варикозном расширении вен нижних

конечностей, в том числе осложненных воспалительным процессом и геморрое, комбинированный препарат «Эсфлазид», представляющий собой отечественный аналог зарубежного препарата «Эскузан». Открытые источники указывают, что препарат «Эсфлазид» производился в форме таблеток зеленовато-жёлтого цвета и содержал в своём составе эсцин (0,005 г) – сапонин плодов конского каштана, а также флавазиды (0,025 г) – комплекс биофлавоноидов, выделенный из листьев каштана конского [172]. Однако в настоящее время препарат снят с производства и на него отсутствует действующее регистрационное удостоверение.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. Каштан конский обыкновенный (*Aesculus hippocastanum* L.), относящийся к семейству Конскокаштановые (*Hippocastanaceae*), занимает обособленное систематическое положение в порядке Сапиндоцветные (*Sapindales*). Несмотря на тривиальное название, вид не имеет систематического сродства с настоящими каштанами семейства Буковые (*Fagaceae*). Эпитет «обыкновенный» обеспечивает чёткую идентификацию данного вида среди 15 близкородственных представителей рода *Aesculus*, что принципиально важно для стандартизации ЛРС;

2. Каштан конский обыкновенный, является широко распространенным растением в средней полосы и юга РФ. Активно культивируется в РФ, в том числе в условиях северо-западных областей и южного Урала, демонстрируя высокую адаптацию к климатическим условиям и почвам, а также значительную морфологическую изменчивость. Тем не менее, в научной литературе нет исследований, посвященных изучению вариабельности химического состава БАВ сырья в различных эколого-географических условиях культивирования на территории РФ, что не позволяет научно обосновать нормативы к его качеству;

3. Химический состав семян каштана конского на данный момент исследован достаточно подробно. В то же время значительная часть растительной биомассы остаётся невостребованной. Причинами этого служат недостаток сведений о химическом составе других морфологических частей растения,

отсутствие данных об их фармакологической активности и методах стандартизации. В настоящее время проводятся исследования по определению химического состава листьев, цветков, экзокарпа плодов, почек и возможности использования их в качестве возможных источников БАВ. Данные о содержании БАВ в других морфологических органах растения разрознены. Листья, кора, цветки, почки и побеги используются только в народной медицине;

4. На основе анализа публикаций, доступных по базам данных e-library и PubMed за период с 1980 г по настоящее время, а также действующей современной НД, проведен сравнительный анализ методов определения ТС в растительном сырье, лекарственных препаратах и БАД. Сравнение подходов к оценке качества семян, содержащих ТС, используемых в РФ и Европейском Союзе, показывает, что ВЭЖХ и ТСХ являются наиболее распространенными методами идентификации указанных соединений, тогда как количественный анализ проводится методами спектрофотометрии и (У)ВЭЖХ;

5. Анализ литературы показал, цветки каштана конского на сегодняшний день изучены в недостаточной степени, что делает их перспективным растительным сырьем для дальнейших фармакогностических исследований. В отечественной и зарубежной научной литературе встречаются единичные работы, посвященные изучению морфолого-анатомических признаков цветков данного лекарственного растения, однако полностью отсутствует информация о микроскопических признаках измельченного сырья и порошка, что подчеркивает актуальность работы. Отдельные фрагментарные данные не дают представления о люминесцентных признаках изучаемого сырья. Неполно охарактеризованы также особенности морфологии и анатомии всех структур цветка методом световой микроскопии;

6. Фармакопейным сырьем каштана конского обыкновенного являются семена, стандартизирующиеся по содержанию ТС. Цветки, как отдельный вид сырья, выгодно отличаются от семян уникальным сочетанием эсцина и комплекса биофлавоноидов, которые следует считать целевыми группами БАВ, обеспечивающими известный венотропный фармакологический эффект;

7. Проведенные маркетинговые исследования зарегистрированных ЛП на основе семян каштана конского, обращающихся на фармацевтическом рынке РФ показали, что в РФ зарегистрировано 6 ЛП на основе семян каштана конского, 4 из которых являются венотонизирующими средствами. Отсутствие ЛП на основе цветков каштана актуализирует исследования по изучению и внедрению нефармакопейных частей данного растения, а также разработке отечественных ЛП на основе возобновляемого и доступного растительного сырья.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика объекта исследования

Объектом исследования служили высушенные воздушно-теневым методом цветки каштана конского обыкновенного, заготовленные в Петрозаводском городском округе (61.84501 с.ш. 34.39094 в.д.), Ленинградской (59.75432 с.ш., 30.19781 в.д.), Московской (55.502041 с.ш., 37.800805 в.д.), Воронежской (51.834028 с.ш., 39.382854 в.д.), Волгоградской (48.58188 с.ш., 44.67911 в.д.) областях и Ставропольском крае (44.0755 с.ш., 43.01117 в.д.) во время цветения в 2021-2024 году. Выбор регионов заготовки сырья был обусловлен, во-первых, традиционным естественным ареалом культивирования данного растения (Глава 1, п. 1.4), во-вторых, необходимостью оценки влияния совокупности природных факторов окружающей среды на показатели качества сырья. Обобщенные данные о характеристике природных условий [53] в изучаемых регионах заготовки цветков каштана конского за последние 30 лет (на примере Европейской части РФ) приведены в Таблице 10.

Таблица 10 – Характеристика природных условий в изучаемых регионах заготовки цветков каштана конского

№ п/п	Климатический фактор	Регион заготовки					
		Петрозаводский городской округ	Ленинградская обл.	Московская обл.	Воронежская обл.	Волгоградская обл.	Ставропольский край
	1	2	3	4	5	6	7
1	Среднегодовое количество осадков, мм в год	650	668	669	518	363	767

Продолжение таблицы 10

	1	2	3	4	5	6	7
2	Тип почв	Подзолы иллювиально-железистые, иллювиально-гумусовые, торфяные и дерново-подзолистые	Подзолы глеевые торфянистые и торфяные иллювиально-гумусовые	Дерново-подзолистые преимущественно мелко- и неглубоко подзолистые	Черноземы обыкновенные	Черноземы южные	Черноземы южные и обыкновенные мицеллярно-карбонатные (глубокие карбонатные)
3	Среднегодовая температура, °С	3,8	6,3	5,8	10	12	9,9
4	Количество солнечных дней	63	85	105	138	158	140
5	Климатический пояс	Умеренный					
6	Тип климата	Умеренно континентальный с чертами морского	Атлантико-континентальный	Умеренно континентальный		Континентальный	Умеренно континентальный
7	Средняя температура января, °С	-8,7	-7,9	-9	-10	-7	-3,5
8	Средняя температура июля, °С	+17,6	+17,5	+18,3	+20	+24	+22,4

2.2. Макро- и микроскопическое исследование

По общепринятым методикам проводили: «макро- и микроскопический анализ, изучение характеристик подлинности сырья (внешние и анатомические признаки) – в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи (ОФС) 1.5.1.0004 «Цветки» и ОФС.1.5.3.0003 «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения» ГФ РФ XV. Внешние морфологические признаки

сырья были изучены методом стериомикроскопии, для анализа был использован микроскоп Биомед-2 (Россия)» [26, 134]. Люминесценцию тканей цветков каштана исследовали с применением люминесцентного микроскопа Микромед – 3 ЛЮМ (Россия) с голубым светофильтром; источником света служила высоковольтная ртутная лампа мощностью 100 Вт, пробоподготовка не применялась.

Микроскопическое исследование сырья проводили с помощью микроскопа Биомед – 6 (Россия), окуляры х 40, х100 и х400. Визуализацию диагностических признаков, определение их числовых характеристик и микрофотографирование осуществляли с помощью цифровой видеокамеры «Levenhuk» C310 NG (КНР) с программным обеспечением Top View (×86). Изучаемое сырье подвергали анализу после предварительного кипячения в растворе натрия гидроксида 2,5% в течение 1 минуты. Числовые характеристики цветков определяли с использованием окуляр-микрометра.

По общепринятым методикам: «исследование цветков каштана конского методом растровой электронной микроскопии проводили после предварительного напыления тонкой углеродной плёнки на установке магнетронного типа для обеспечения проводимости. Анализ выполняли на растровом электронном микроскопе JSM-6380LV JEOL (Япония), оснащённом системой микроанализа INCA 250 (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»)» [134].

2.3. Определение показателей качества

В соответствии с методиками, изложенными в ГФ РФ XV: «проводили определение фармакопейных показателей качества, таких как влажность, зола общая и нерастворимая в 10%-ной хлористоводородной кислоте, измельченность, содержание примесей ОФС 1.5.3.0004 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»; ОФС.1.2.2.2.0013 «Зола общая»; ОФС 1.5.3.0005 «Зола, нерастворимая хлористоводородной кислоте»; ОФС 1.5.3.0007

«Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»» [26].

2.4. Определение элементного состава

Перед проведением эксперимента, образцы цветков каштана конского подвергались измельчению до размера частиц сырья 0,5-1 мм. Точные навески образцов сырья помещали в патрон из фторопласта и добавляли смесь плавиковой и азотной кислот и далее подвергали кислотному разложению с помощью систем микроволновой пробоподготовки. Пробу троекратно промывали деионизированной водой. Аликвоту отбирали автоматическим дозатором (1,0 мл), доводили до 10 мл азотной кислотой и использовали для определения элементного состава. Правильность определения контролировали с помощью метода добавок. Для получения рабочих стандартных растворов смешивали нескольких опорных многоэлементных стандартных растворов для масс-спектрометрии (Perkin-Elmer) [181]. Минеральный состав исследуемых объектов изучали методом хромато-масс-спектроскопии с индуктивно связанной плазмой с использованием системы "ELAN-DRC". Перед проведением эксперимента, образцы цветков каштана конского подвергались измельчению до размера частиц сырья 0,5-1 мм. Точные навески образцов сырья помещали в патрон из фторопласта и добавляли смесь плавиковой и азотной кислот и далее подвергали кислотному разложению с помощью систем микроволновой пробоподготовки. Пробу троекратно промывали деионизированной водой. Аликвоту отбирали автоматическим дозатором (1,0 мл), доводили до 10 мл азотной кислотой и использовали для определения элементного состава. Правильность определения контролировали с помощью метода добавок. Для получения рабочих стандартных растворов смешивали нескольких опорных многоэлементных стандартных растворов для масс-спектрометрии (Perkin-Elmer). Согласно стандартным методикам: «для расчета коэффициента биологического накопления минеральных компонентов в цветках каштана конского исследованию подвергалась также и почва с места произрастания растения. Отбор почвы проводился в момент заготовки растительного сырья, образцы высушивались до постоянной массы,

просеивались через сито с диаметром отверстий 0,5 мм» [181]. Стандарты для анализа почв: «почва дерновоподзолистая ГСО 5360-90, ООКО-153, почва дерновоподзолистая супесчаная ГСО 2498-83-2500-83, СДПС-1, СДПС-2, СДПС-3. Стандарты для анализа цветков: ГСО состава травосмеси (Тр-1), ГСО 8922-2007, ГСО состава элодеи канадской (ЗК-1), ГСО 8921-2007, ГСО состава листа березы (ЛБ-1), ГСО 8923-2007» [106, 134, 173].

2.5. Определение радионуклидов

Исследование содержания радионуклидов проводили: «на базе ФГБУ «Россельхозцентр» по методикам Государственный стандарт (ГОСТ) 32161-2013 «Продукты пищевые. Метод определения содержания цезия CS-137» и ГОСТ 32163-2013 «Продукты пищевые. Метод определения содержания стронция Sr-90»» [21, 22, 134].

2.6. Определение остаточных пестицидов

Исследования по определению остаточных органических пестицидов в цветках каштана конского проводили методом ГХ/МС на хромато-масс-спектрометрическом комплексе «Хроматэк-Кристалл 5000.2» (Россия) в соответствии с указаниями ОФС.1.5.3.0011 «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» ГФ РФ XV издания [26, 88]. Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили в режиме селективного детектирования индивидуальных ионов с идентификацией пестицидов по характеристическим ионам и времени удерживания с использованием стандартных растворов хлорорганических пестицидов, производных гексахлорциклогексана (ГХЦГ) – α-ГХЦГ, β-ГХЦГ, γ-ГХЦГ и соединений группы дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) и его метаболитов – дихлордифенилдихлорэтана (ДДД) и дихлордифенилдихлорэтилена (ДДЕ).

2.7. Определение суммы экстрактивных веществ

Определение экстрактивных веществ проводили в соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.0006 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»

(метод 1) [26]. В качестве экстрагентов использовали растворители: вода очищенная, спирт этиловый 20%, 40%, 70% и 96%.

2.8. Качественный анализ биологически активных веществ

С учетом положений, изложенных в литературе: «для определения качественного состава готовили водные и водно-спиртовые извлечения из исследуемых образцов по общепринятым методикам. Для получения водных извлечений 1,0 г измельченного сырья заливали 30 мл воды очищенной и настаивали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. Полученное извлечение фильтровали и использовали для определения полисахаридов, водорастворимых сапонинов, алкалоидов, дубильных веществ и органических кислот. Водно-спиртовые извлечения получали в том же соотношении экстракцией 70%-ным этанолом с последующим охлаждением и фильтрованием для обнаружения спирторастворимых сапонинов, флавоноидов и антоцианов. Качественное определение отдельных групп БАВ проводили с использованием общепринятых качественных реакций» [102, 134, 175].

«Дополнительное обнаружение флавоноидов, сапонинов, аминокислот, сахаров и разделение комплекса антоцианов проводили методом ТСХ на пластинах «Silica gel 60 F254» на алюминиевой подложке (Merk, Германия), Sorbifil-ПТСХ-АФ-А-УФ и Sorbifil-ПТСХ-АФ-А (ЗАО «Сорбфил», Краснодарский край, Россия), нанесение проб осуществляли микрошприцем МШ-10 (Агат, Россия)» [39, 50, 134] .

«Для получения хроматографических профилей флавоноидов использовали извлечение, полученное по разработанной методике» [39, 50] Хроматографирование 10 мкл извлечения (n=3-5) осуществляли на пластинках марки «Silica gel 60 F254» на алюминиевой подложке («Мерк», Германия) в ранее подобранном элюенте: этилацетат – ледяная уксусная кислота – вода (5:1:1), детектируя пластины 5% спиртовым раствором алюминия хлорида или 5% спиртовым раствором натрия гидроксида при просмотре в УФ-свете (365 нм). Параллельно хроматографировали по 5 мкл 0,1% стандартных растворов рутина, кверцетина и апигенина.

Для получения хроматографических профилей сапонинов использовали извлечение, полученное по разработанной методике (Глава 5, п. 5.4.2.1). Хроматографирование 10 мкл извлечения (n=3-5) осуществляли на пластинках марки «Sorbfil» на алюминиевой подложке («Сорбфил», Россия) в ранее подобранном элюенте: н-бутанол – этанол – аммиак (7:2:5), детектируя пластины 25% раствором фосфорновольфрамовой кислоты в спирте этиловом с последующим нагреванием при 105ºС при просмотре в видимом свете. Параллельно хроматографировали 5 мкл 0,1% стандартного раствора β-эсцина [111].

Разделение простых сахаров в тонком слое сорбента осуществляли на пластинках марки «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А размером 10×15 см (ЗАО «Сорбфил», Краснодарский край, Россия), используя в качестве элюента систему н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2) [116]. Детектирование проводили раствором, содержащим 0,86 г сульфаниламида и 0,83 г о-фталевой кислоты в 50 мл 95% этилового спирта и высушивали при температуре 103±2°С в течение 3-5 минут до проявления хроматографических зон. Параллельно хроматографировали по 2 мкл 1% водных растворов СО моносахаридов: глюкозы, ксилозы, рамнозы [37].

В качестве подвижной фазы для идентификации аминокислот методом ТСХ использовали систему бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:2) при высоте пробега элюента не менее 13 см. Проявитель 1,0% раствор нингидрина в спирте [36].

2.9. Количественное определение биологически активных веществ

Для количественного определения БАВ в растительном сырье методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой в видимой области спектра был использован спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ «Спекр», СПб, Россия), применялись кюветы изготовленные из кварцевого стекла с толщиной стенки один сантиметр. Согласно стандартным методикам: «измерения проводились относительно растворов сравнения» [134].

«Количественное определение флавоноидов, сапонинов и антоцианов проводили по разработанным и валидированным методикам» [134] (Глава 5, п. 5.3.1.1., п. 5.3.2.1., п. 5.4.2.1).

Газохроматографический анализ для идентификации отдельных представителей фракции фитостеринов в цветках каштана конского проводили на ГХ/МС комплексе Agilent Technologies 7890B GC System с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5977A MSD (Германия). Температура узла ввода пробы – 310 °С, аналитического интерфейса – 290 °С. Разделение проводили на капиллярной колонке HP-5ms UI с неподвижной фазой (5% фенил)-метилполисилоксан (30 м × 0,250 мм × 0,25 μм). Скорость потока газа носителя – 1 мл/мин. Объем вводимой пробы – 0,5 мкл, деление потока 40 : 1, температурный режим: 40 °С – изотерма 18 мин, нагрев 5 °С/мин до 220 °С, затем нагрев со скоростью 10 °С/мин до 310 °С, далее изотерма. Регистрацию сигнала проводили по полному ионному току (TIC) в диапазоне масс 29–700 m/z. Идентификацию компонентов проводили с помощью библиотеки масс-спектров NIST20. Процент совпадения с базой для идентифицированных компонентов составлял более 80%. При совпадении на 70% и менее компоненты считались неидентифицированными. Количественное содержание компонентов выделенных фракций осуществляли методом внутренней нормализации. Извлечения из исследуемого сырья проводили по методике ГФ РФ XV изд. ОФС.1.5.3.0005 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах») (метод 1) с применением спирта 96% этилового в качестве экстрагента [26]. Следует отметить, что в работе при анализе состава экстракта осуществлялось прямое введение образца в хроматограф без пробоподготовки и дериватизации, поэтому следует считать, что проанализировать удалось только те компоненты экстракта, что являются летучими в условиях анализа (что составляет от 5 до 15% введенной пробы). Исследование проводили с использованием парка оборудования ЦКП ФГБОУ ВО ВГУ Министерства высшего образования и науки России.

Количественное определение содержания суммы полисахаридов в ЛРС после осаждения спиртом этиловым 95% проводили согласно соответствующей гравиметрической фармакопейной методике ГФ РФ XIV изд. ФС.2.5.0032.15 «Подорожника большого листья» [27].

Содержание суммы свободных и связанных простых сахаров в пересчете на глюкозу в сырье определяли с применением фармакопейной спектрофотометрической методики по реакции простых сахаров с пикриновой кислотой (пикриновый метод) по ГФ РФ XIV [27] (ФС.2.5.0027.15 «Мать-и-мачехи обыкновенной листья») и ГФ РФ XV [26] (ФС.2.5.0024 «Липы цветки» и ОФС.1.2.3.0019 «Определение сахаров спектрофотометрическим методом») [26].

Определение содержания суммы органических кислот в пересчёте на яблочную кислоту проводили: «по методике, изложенной в ФС.2.5.0093 ГФ РФ XV изд. «Рябины обыкновенной плоды»» [26, 53]

Определение суммы дубильных веществ в пересчете на танин проводили в соответствии с ОФС.1.5.3.0008.18 ГФ РФ XV изд. «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [26].

Определение содержания аскорбиновой кислоты в цветках каштана конского различных регионов произрастания, проводили с использованием титриметрической методики, представленной в ФС.2.5.0106.18 ГФ РФ XIV изд. «Шиповника плоды» [27, 53].

Определение суммы свободных аминокислот (АК) в цветках каштана конского проводили с применением дифференциальной спектрофотометрии в аналитическом максимуме 568 ± 2 нм, по унифицированной методике, основанной на измерении оптической плотности продуктов реакции АК водного извлечения из ЛРС с 1% спиртовым раствором нингидрина [141].

«Для установления состава свободных органических кислот и полного состава аминокислот: «изучаемое сырье анализировали методом КЭ на приборе «Капель-105/105М» (Россия, СПб, «Люмекс»)»» [87, 164]. «Определение проводили на базе испытательного лабораторного центра АНО «НТЦ

Комбикорм» (Воронеж). Для исследования полного аминокислотного состава (свободные и связанные АК) навески образцов гидролизовали 6 М соляной кислотой при температуре 110±5 °С в течение 16–18 часов по методике ГОСТ Р 55569-2013 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение протеиногенных аминокислот методом капиллярного электрофореза»» [23, 36, 89, 134, 160]. Условия анализа представлены в Таблице 11.

Таблица 11 – Условия анализа органических кислот и аминокислот методом КЭ

Параметр	Условия анализа	
	Органические кислоты	Аминокислоты
Буфер	Фосфатный	Фосфатный
Напряжение	17 кВ	25кВ
Капилляр	Lэфф./Lобщ = 40/50 см, ID = 50 мкм	Lэфф./Lобщ = 65/75 см, ID = 50 мкм
Ввод пробы	300 мбар с	150 мбар с
Температура	+20 °С	+30 °С
Детектирование	Косвенное при 190 нм	Прямое при 254 нм

2.10. Изучение профиля ИК-спектров цветков каштана конского

Изучение цветков каштана конского методом ИКС проведены с помощью научно-технической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ВГУ: «ИК-спектры были получены без предварительной пробоподготовки на приборе ИК-Фурье-спектрометр VERTEX 70 (Bruker, Германия) методом НПВО и последующей обработкой программой OMNIC. Спектры НПВО получали на стандартной приставке с горизонтальным расположением элемента и устройством поджатия порошкообразных проб, что позволяло получать хорошо выраженные спектры при полном контакте образца со всей рабочей поверхностью кристалла» [134].

2.11. Изучение фармакологического действия цветков каштана конского

Для проведения прогностической оценки *in silico* фармакологической активности и вероятных токсических эффектов использовали электронный сервис PassOnline [252]. Оценивали значения: «Pa – вероятность наличия фармакологической активности/побочного эффекта, считая результат значимым при показателе >0,7; Pi – вероятность отсутствия фармакологической

активности/побочного эффекта. Если Pa>Pi – оцениваемый эффект присутствует с большой долей вероятности» [134].

Антиокислительную активность извлечений из цветков каштана конского определяли с помощью известных спектрофотометрической [117] и титриметрической методик [114].

Доклинические исследования биостимулирующего и/или биоцидного действия настоя цветков каштана конского *in vitro* проводили в «лаборатории кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ВГУ с использованием тест-системы инфузорий *Paramecium caudatum*. Исследования проводили с использованием автоматизированного аппаратно-программного комплекса «БиоЛат 3.2» производства ООО «Европолитест», Россия» [64].

В основе работы прибора принцип преобразования видеоизображения лунки с тест-организмами в цифровой сигнал, который передается на компьютер через порт USB. При помощи специализированного программного обеспечения AutoCiliata осуществляется подсчет тест-организмов и управление перемещением планшета. Подсчет осуществляется в режиме реального времени непрерывно по определенному алгоритму. Лунки позиционируются под объективы двух видеокамер по специальным алгоритмам, заданным в программе. Характеристики аналоговой видеосистемы, входящей в состав прибора: разрешающая способность, не менее 800ТВ линий; чувствительность не более 0,1 люкс; сила света устройства подсветки - не менее 56 кд. Прибор оснащен лунками из прозрачного полимера, в исследовании использовано 10 лунок диаметром 15 мм. Два устройства подсветки обеспечивают равномерную освещенность лунок и состоят из 8 светодиодов для каждого осветителя. На верхнем основании установлены две цифровые бескорпусные видеокамеры.

Для проведения эксперимента по общепринятой методике: «приготовлена среда для культивирования тест-системы инфузорий (*Paramecium caudatum* Ehrenberg)» [148] – среда Лозина-Лозинского согласно ГОСТ Р 57166-2016 [24, 64] со следующим составом: NaCl - 1,0 г, KCl - 0,1 г, $MgSO_4$ - 0,1 г, $CaCl_2$ - 0,1 г, $NaHCO_3$ - 0,2 г, вода дистиллированная – до 1 л. Рабочий раствор приготовлен

разбавлением концентрированной среды 1 к 9 водой дистиллированной. По методике: «инфузории *Paramecium caudatum* культивировались в течении 7 дней в термостате при температуре 21±1°С при 10 часовом искусственном освещении» [64, 134].

Исходя из методических положений: «для нормирования начального состояния тест-системы культуру инфузорий промывали раствором Лозина-Лозинского и проводили синхронизацию культуры инфузорий посредством метода тепловых шоков: культуру нагревали на водяной бане до +35°С и быстро остужали в воде со льдом до +5°С, повторяя данную процедуру 3 раза. После этого инкубировали в течении двух суток в термостате в чистой среде. Для эксперимента использовали инфузорий, которые равномерно плавают в объеме среды, не оседая на дно пробирки. Исследования проведены согласно утвержденным «Методическим рекомендациям к автоматизированному методу оценки токсичности продуктов животного происхождения, кормов и объектов окружающей среды на инфузориях *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena Pyriformis*»» [64].

Опираясь на литературные данные: «проведено изучение биоцидного/биостимулирующего действия 3 различных концентраций настоя цветков каштана конского: «10%, 1%, 0,1%; что соответствует предполагаемым диапазонам терапевтических доз, известным по данным доклинических исследований и рекомендуемым допустимым уровням потребления БАВ. Проведено 5 серий опытов для 5 концентраций настоя, в каждой из серий опытов исследования проводили параллельно одновременно в контрольной и опытных пробах, каждая из контрольной и опытных проб выполнена в 5 лунках прибора при 5 повторностях измерений, что позволило получить статистически достоверную выборку. Для каждой из концентраций проведены испытания для 4 сроков экспозиции – сразу после добавления в опытную пробу и затем через 1, 2 и 24 часов инкубации в термостате при постоянной температуре 21±1°С и искусственном освещении. Выбор сроков экспозиции обусловлен тем, что для достижения максимальной концентрации изучаемой субстанции в биологической

среде как правило требуется время не менее 1 ч, при этом длительность поддержания эффективной концентрации как правило не превышает 6 ч при однократном применении. При проведении исследования в 5 лунок вносили по 270 мкл инфузорий *Paramecium caudatum* и 30 мкл 10% раствора настоя цветков каштана для получения концентрации раствора настоя с инфузориями 1%. В оставшиеся 5 лунок вносили 300 мкл объема контрольной пробы инфузорий и запускали автоматизированный биотест токсичности *Paramecium* со следующими параметрами: время перед подсчетом – 1800 мс; время между кадрами – 1800 мс; время экспозиции – 3 минуты. Одновременно с этим добавляли к 18 мл среды с инфузориями 2 мл 10% раствора настоя для получения концентрации раствора настоя цветков с инфузориями 1% и отправляли колбу с наведенный раствором на инкубацию в течении 1, 2 и 6 часов в термостате при постоянной температуре 21±1°С и искусственном освещении» [64]. По той же методике: «готовили и испытывали разведения настоя из цветков каштана конского с концентрациями 1%; 0,1%». Аналогичные манипуляции осуществляли для приготовления и тестирования растворов настоя цветков каштана конского с концентрациями 1%; 0,1%.

Также проводили оценку мембранопротекторного действия изучаемых объектов, согласно использованной методике: «для этого подобрали количество токсического агента NaCl раствор 10%, вызывающее гибель 90% инфузорий в течении 3 мин. Объем 10 % натрия хлорида вызывающий гибель 90 % инфузорий составил 48 мкл. При проведении исследования в 5 лунок вносили по 270 мкл инфузорий *Paramecium caudatum* и 30 мкл 10% раствора настоя цветков для получения концентрации раствора настоя с инфузориями 1%. В оставшиеся 5 лунок вносили 300 мкл объема контрольной пробы инфузорий и добавляли 48 мкл 10% раствора NaCl, после чего запускали автоматизированный биотест токсичности *Paramecium* со следующими параметрами: время перед подсчетом – 1800 мс; время между кадрами – 1800 мс; время экспозиции – 3 минуты. Измерение проводили в цикл каждые 63 секунды. В результате получали количество инфузорий сразу после добавления 10% раствора NaCl, через 1, 2, 3 и

4 мин. при единичном подсчете» [64]. Аналогичные манипуляции осуществляли для приготовления и тестирования растворов настоя цветков с концентрациями 1%; 0,1% при разном времени инкубации (0 часов, 1, 2 и 24 часов). Согласно методике: «приготовление водного извлечения по типу настоя для исследования биостимулирующего и/или биоцидного действия *in vitro*, было обусловлено спецификой проводимого эксперимента по оценке токсического, биостимулирующего и мембранопротекторного действия *in vitro* с использованием тест-системы инфузорий вида инфузория-туфелька *Paramecium caudatum*. Введение спирта в среду культивирования могло бы выступать самостоятельным стрессорным фактором, изменяя подвижность и жизнеспособность инфузорий, вплоть до выраженного угнетения моторики, что затрудняет интерпретацию эффекта, оказываемого исследуемым объектом. Кроме того, водное извлечение позволяет целенаправленно исследовать влияние гидрофильной фракции БАВ» [64].

Работа осуществлялась в соответствии с актуальными методическими рекомендациями и требованиями руководств по доклиническим исследованиям [134, 143].

Антимикробную и фунгицидную активности исследуемых образцов оценивали методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде – бульоне Мюллера–Хинтон в отношении пяти клинически значимых штаммов микроорганизмов, являющихся распространенными возбудителями гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей: Грамотрицательные бактерии (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*); грамположительные бактерии (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*); дрожжевой грибок (*Candida albicans*). Данный метод позволяет определить минимальную подавляющую концентрацию (МПК), то есть минимальную концентрацию исследуемого образца, полностью ингибирующую видимый рост тест-микроорганизма в условиях *in vitro*. Для каждого из исследуемых образцов – жидкого экстракта и 70% этилового спирта – готовили ряд последовательных двукратных разведений в бульоне Мюллера–Хинтон. Конечные разведения составляли 1:2, 1:4, 1:8, 1:16,

1:32, 1:64, 1:128, 1:256 и 1:512. В каждую пробирку с соответствующим разведением вносили суспензию тест-культуры микроорганизма, стандартизованную по мутности до 0,5 единиц по стандарту МакФарланда. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 18–24 ч, после чего результаты учитывали визуально по наличию или отсутствию помутнения питательной среды, свидетельствующего о росте микроорганизмов. В качестве критерия антибактериальной активности принимали МПК – наибольшее разведение исследуемого образца, при котором отсутствовал видимый рост тест-микроорганизма. Для обеспечения достоверности результатов в каждом опыте ставили контрольные пробы: контроль стерильности питательной среды, контроль стерильности исследуемого образца и контроль жизнеспособности тест-культуры. Контроль стерильности среды представлял собой пробирку с бульоном Мюллера–Хинтон без внесения микроорганизмов и исследуемого образца; отсутствие роста подтверждало стерильность питательной среды. Контроль стерильности образца включал пробирку с исследуемым образцом в питательной среде без внесения микроорганизмов; отсутствие роста свидетельствовало об отсутствии контаминации образца. Контроль жизнеспособности представлял собой пробирку с бульоном Мюллера–Хинтон и тест-культурой без добавления исследуемых образцов; наличие роста подтверждало сохранение жизнеспособности микроорганизмов и адекватность условий культивирования [25]. Исследования антибактериальной активности выполнены на базе лаборатории культуромных и протеомных исследований в микробиологии НОПЦ ГЛТ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России 20.02.2026 г.

2.12. Выбор оптимальных лекарственных форм

С целью подбора наиболее оптимальной ЛФ получали водные извлечения из растительного сырья по типу настоя, водно-спиртовые извлечения по типу жидкого экстракта и настоек. Настойки изготавливали с применением различных технологических приёмов (мацерация, перколяция, дробная мацерация). Для извлечения целевых групп БАВ – флавоноидов и сапонинов из сырья при изготовлении ЛФ использовали 70% этанол, поскольку данный экстрагент

обеспечивает наибольший выход, что было показано нами ранее при разработке методики их количественного определения в изучаемом ЛРС. [50, 76, 134].

Все исследуемые извлечения готовили из цветков, заготовленных на территории Воронежской области в период массового цветения в 2024 году, что соответствовало ранее полученным результатам комплексного фитохимического исследования, где были установлены оптимальные сроки заготовки данного ЛРС [45].

Лабораторные образцы водных и водно-спиртовых извлечений по типу настоя, настоек и жидкого экстракта изготавливали в соответствии с классическими технологическими методиками описанными в руководствах по изготовлению ЖЛФ [26, 54, 92].

Настой готовили в соответствии с требованиями для цветков в соотношении 1:10 по ОФС «Настои и отвары» [26, 54, 92]. Коэффициент водопоглощения определяли на основании: «ОФС.1.5.3.0012 «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья»» [26, 54, 92]. Согласно экспериментальным данным коэффициент водопоглощения равен 3,1 мл/г [134].

Настойку готовили в соотношении 1:5. Настойки получали методами дробной мацерации, мацерации, перколяции [54, 92]. Также был определен коэффициент спиртопоглощения для цветков каштана конского, равный 2,5 мл/г [84].

Экстракт жидкий в получали соотношении 1:1 методом перколяции [54, 92].

Полученные лабораторные образцы ЖЛФ дополнительно стандартизировались по показателям, соответствующим конкретной ЛФ и описанным в ОФС.1.4.1.0018 «Настои и отвары», ОФС.1.4.1.0019 «Настойки» и ОФС.1.4.1.0021 «Экстракты» ГФ РФ XV [26].

Идентификацию изучаемых групп БАВ лабораторных образцов ЖЛФ осуществляли методом ТСХ. Условия разделения обобщены в Таблице 12. Пробы наносили микрошприцем МШ-10 (Агат, Россия). В работе использовали растворители и реактивы марки х.ч. (ЗАО «Вектон», СПб, Россия).

Таблица 12 – Условия разделения основных групп БАВ ЖЛФ цветков каштана конского обыкновенного методом ТСХ [111]

Элюент	Детекция зон	Растворы СО	Тип и марка пластины
Флавоноиды [50]			
этилацетат: ледяная уксусная кислота: вода (5:1:1)	5% спиртовой раствор алюминия хлорида или 10% спиртовой раствор натрия гидроксида с высушиванием при 103±2°С при просмотре в УФ-свете при 365 нм	5 мкл 0,1% спиртовых растворов СО рутина (CAS №153-18-4), кверцетина (CAS №849061-97-8) и апигенина (CAS №578-74-5) (ЗАО «Вектон», СПб, Россия, степень чистоты не менее 99%)	«Silica gel 60 F254» на алюминиевой подложке 10×15 см («Мерк», Германия)
Сапонины			
н-бутанол: этанол: аммиак (7:2:5)	25% раствор фосфорновольфрамовой кислоты в спирте этиловом с последующим нагреванием при 105ºС при просмотре в видимом свете	5 мкл 0,1% раствора СО β-эсцина (CAS №6805-41-0) в спирте этиловом 70%	«Sorbfil» ПТСХ-АФ-А 10×10 см (ЗАО «Сорбфил», Краснодарский край, Россия)

2.13. Характеристика реактивов и материалов

Опираясь на литературные данные: «в работе использованы реактивы, индикаторы и растворители марки х.ч. и ч.д.а. (ЗАО «Вектон», СПб, Россия; ООО «Сигма Тек», Химки, Россия). Для приготовления элюентов в ТСХ использовали растворители марки х.ч. и сорта «для хроматографии» (ЗАО «Вектон», СПб, Россия)» [134].

В соответствии с: «ОФС 1.3.0002 «Титрованные растворы» и ОФС 1.3.0001 «Реактивы. Индикаторы» ГФ РФ XV изд. проводили приготовление титрованных растворов, реактивов и индикаторов» [26].

2.14. Описание использованных стандартных образцов

Опираясь на литературные данные и стандартные процедуры фитохимического анализа: «в работе при идентификации и количественном определении различных групп БАВ изучаемого ЛРС использовали следующие

СО, которые имели степень чистоты не менее 99%: рутин (CAS №153-18-4) (ЗАО «Вектон», СПб, Россия), кверцетин (CAS №849061-97-8), апигенин (CAS №578-74-5) (ЗАО «Вектон», СПб, Россия); β-эсцин (CAS №6805-41-0) (Sigma-Aldrich, США); D(+)-глюкоза (CAS №50-99-7), ксилоза (CAS №58-86-6), рамноза (CAS №10030-85-0) (ЗАО «Вектон», СПб, Россия); аргинин, пролин, глицин, L-глутаминовая кислота (CAS №56-86-0), валин, метионин, лейцин, фенилаланин (ЗАО «Вектон», СПб, Россия)» [26, 84, 134]. Срок годности до 10.2026 г.

Приготовление СО проводили в соответствие с НД [26].

2.15. Статистическая обработка результатов

Согласно теоретическим подходам: «экспериментальные данные обрабатывали в соответствии с требованиями ОФС ГФ РФ XV изд. при использовании пакета прикладных программ обеспечения «Microsoft Excel» LTSC MSO, 2021г. (компания-разработчик – Microsoft, США, версия 2108)» [26, 84, 134].

2.16. Определение срока хранения и стабильности растительного сырья

Данные параметры устанавливали в соответствии с ГФ РФ XV издания (ОФС.1.1.0009 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» и ОФС.1.1.0011 «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»).

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ АНАТОМО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ, МОРФОЛОГИИ И ДРУГИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОДЛИННОСТИ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННОСТИ ЦВЕТКОВ КАШТАНА КОНСКОГО

Существует ряд работ, направленных на изучение морфологии и анатомии почек, листьев, цветков и коры каштана конского. Для почек и листьев растения подробно описаны морфолого – анатомические признаки [11, 47, 78, 209, 270]. Менее изучены в этом плане цветки каштана. Традиционные методы световой микроскопии не всегда позволяют в полной мере выявить структурные элементы, обладающие высокой диагностической ценностью. В связи с этим перспективным направлением становится применение люминесцентной микроскопии, обеспечивающей более детальное изучение микроструктур и распределения веществ в тканях растительного сырья. Однако данные о характере люминесценции диагностически значимых признаков подлинности цветков каштана конского, полученные с использованием метода люминесцентной микроскопии, до настоящего времени отсутствуют. Таким образом, актуальным является изучение идентификационных характеристик каштана конского цветков с помощью различных методов микроскопического анализа, что необходимо для разработки проекта НД (разделы «Внешние признаки» и «Микроскопия») [41, 113]. В виду отсутствия различий в анатомо-диагностических признаках и статистически значимых вариаций их числовых характеристик, в данной главе результаты изучения особенностей анатомии и морфологии цветков каштана конского приведены на примере сырья, заготовленного на территории Воронежской области.

3.1. Изучение внешних признаков цветков каштана конского

В соответствии с рекомендациями ГФ РФ XV издания [26] была дана характеристика внешних признаков цельного, измельчённого и порошкованного сырья цветков каштана конского [41, 113]. При изучении морфологических особенностей цельных цветков каштана конского невооруженным глазом и с помощью лупы были описаны следующие характеристики: цельное сырье представляет собой отдельные цветки и их части, отделенные от общей оси

соцветия. Цветки имеют неправильное строение. Чашечка зеленоватого или зеленовато-коричневого цвета, состоит из 5 сросшихся у основания чашелистиков. Венчик беловато-розового или буроватого цвета, имеет 5 лепестков, один из которых незначительных размеров или может отсутствовать. Размер цветков 0,5 – 2,0 см. Тычиночные нити длинные, выходят за пределы венчика (Рисунок 9).

В ходе изучения внешних признаков измельченных цветков каштана конского обыкновенного, выявлено, что они представляют собой смесь кусочков цветков и их частей, отделенных от общей оси соцветия, кусочков чашечки зеленоватого или зеленовато-коричневого цвета и фрагментов венчика беловато-розового или буроватого цвета, проходящие сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм.

Порошок также представляет собой смесь кусочков цветков и их частей, отделенных от общей оси соцветия, кусочков чашечки зеленоватого или зеленовато-коричневого цвета и фрагментов венчика беловато-розового или буроватого цвета, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм.

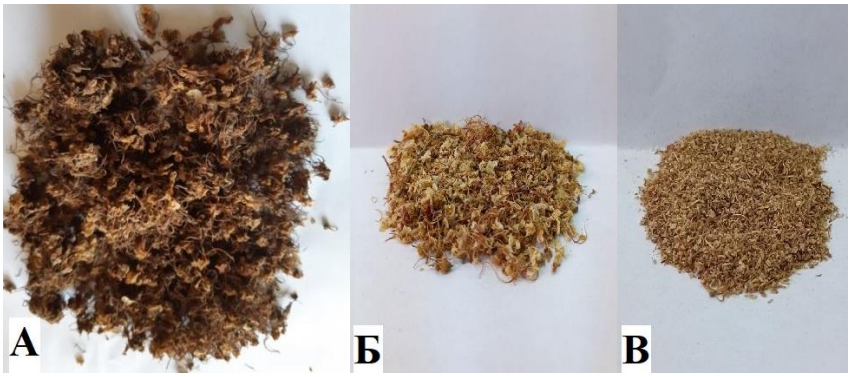


Рисунок 9 – Внешний вид цветков каштана конского: А – цельные; Б – измельченные; В – порошкованные

Для цельного, измельченного и порошкованного сырья характерен слабый, специфический запах.

В результате изучения цельного и измельченного сырья каштана конского цветков с помощью стереомикроскопа (Глава 2, п. 2.2) выявлено, что поверхность

лепестков венчика (Рисунок 10, Ж) и листков чашечки (Рисунок 10, Г) опушены простыми многочисленными волосками различного размера, которые также встречаются на пестике (Рисунок 10, В), тычинках (Рисунок 10, А) и цветоножке (Рисунок 10, Д). Кончики тычинок, как правило, без волосков, на всех частях цветка встречается пыльца, наибольшее её количество расположено на пыльниках (Рисунок 10, Б) [47]. Поверхность цветоноса густо опушена простыми длинными извилистыми буроватыми трихомами (Рисунок 10, Е), части которых визуализируются и на других частях цветка.

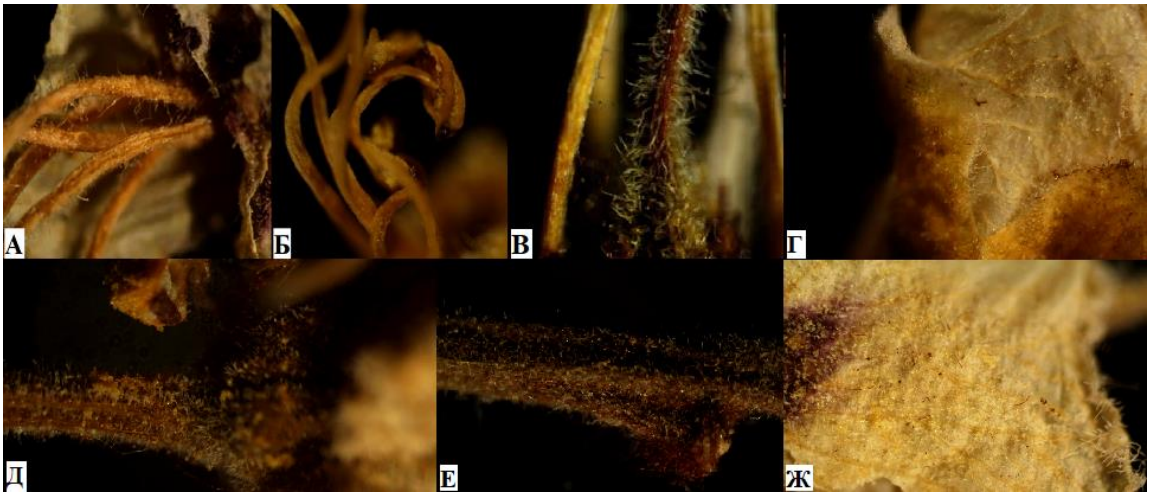


Рисунок 10 – Стереомикроскопическое исследование цветка каштана конского: А – опушение тычиночных нитей, ув.х40; Б - тычиночные нити и пыльник, ув.х40; В – опушение пестика, ув.х40; Г – структура поверхности и опушение края листка чашечки, ув.х40; Д – структура поверхности и опушение цветоножки, ув.х40; Е – бурые извилистые волоски на поверхности цветоноса, ув.х40; Ж – структура поверхности и опушение края лепестка венчика, ув.х40

Цвет лепестков венчика беловато-желтый с коричневыми или оранжево – бурыми прожилками.

3.2. Микроскопические признаки цветков каштана конского

Пробоподготовка к проведению анализа осуществлялась в соответствии с ОФС ГФ РФ XV изд. [26] (Глава 2, п. 2.2). К микродиагностическим признакам анатомического строения цветков каштана конского следует отнести: наличие

крупных, слегка вытянутых, многоугольных или округлых клеток эпидермиса, клеточные стенки имеют четко заметные утолщения (Рисунок 11, В). По краю лепестка отчетливо видны многочисленные простые волоски различного размера, состоящие из одной или нескольких клеток, имеющие грубобородавчатую структуру (Рисунок 11, Б – В). Некоторые волоски открашены в розовый цвет. На поверхности лепестка венчика трихомы встречаются реже. Проводящая система лепестка венчика и листка чашечки представлена сосудами с разным типом утолщения – спиральным и ленточным (Рисунок 11, А). На венчике отмечены скопления светло-жёлтых пыльцевых зёрен округло-эллиптической формы (Рисунок 11, Г).

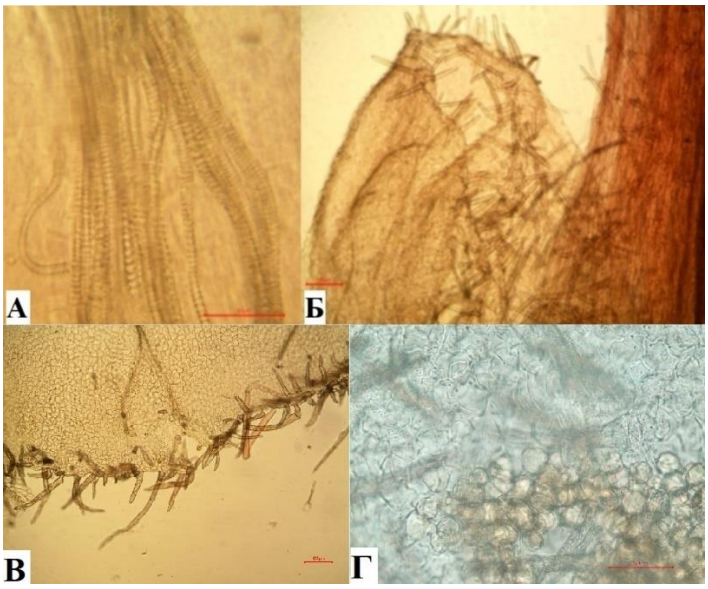


Рисунок 11 – Анатомическое исследование цельного цветка каштана конского: А – проводящая система, ув.х400; Б – простые волоски с грубоборадавчатой поверхностью по краю лепестка венчика и его основания, ув.х100; В – простые волоски с грубоборадавчатой поверхностью по краю лепестка венчика, ув.х100; Г – скопление пыльцевых зёрен на лепестке венчика, ув.х400

При рассмотрении листков чашечки, было установлено, что на ее поверхности присутствует большое количество простых одноклеточных извилистых трихом, которые зачастую перекручиваются и обламываются. Более длинные волоски расположены по краю лепестка (Рисунок 12, А). На поверхности

листка чашечки также визуализированы многочисленные простые одноклеточные вытянутые и многоклеточные волоски, поверхность которых имеет грубобородавчатую структуру (Рисунок 12, Б). Проводящая система чашечки представлена сосудами преимущественно спирального типа (Рисунок 12, В). На поверхности листка чашечки видны крупные устьица, околоустьичная щель полностью окружена несколькими околоустьичными клетками, радиальные клетки одинаковой длины и оболочки соседних клеток на всем протяжении соединены друг с другом. Опираясь на зарубежные исследования, посвященные изучению микроморфологии цветочного нектарника каштана конского мясо-красного (*Aesculus ×carnea* Hayne) – декоративного гибрида полученного в результате скрещивания конского каштана обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) и конского каштана красного (*Aesculus pavia* L.), тип устьичного аппарата цветков каштана конского обыкновенного был установлен как циклоцитный или кольцеклетный (Рисунок 12, Г) [47, 271]. Также хорошо видны места прикрепления волосков в виде овальных образований (Рисунок 12, Г).

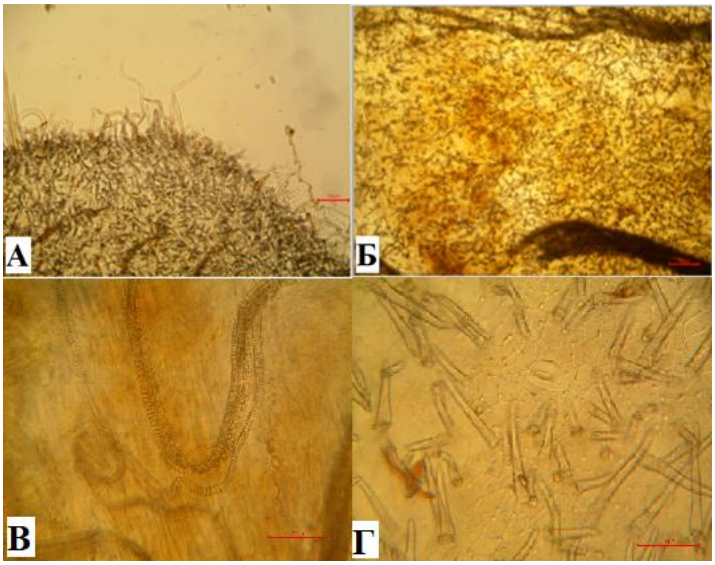


Рисунок 12 – Анатомическое исследование цельного цветка каштана конского: А – простые волоски по краю чашечки, ув. х100; Б – простые волоски на чашечке, ув.х100; В – проводящая система чашечки, ув.х400; Г – простые волоски на чашечке и устьице, ув.х400

На поверхности листочка чашечки (Рисунок 13, А), а также на цветоножке (Рисунок 13, Б) визуализируются головчатые железистые трихомы. Поверхность цветоноса покрыта многочисленными длинными извилистыми многоклеточными трихомами коричневого или буроватого цвета, части которых также визуализируются при анализе других частей цветка каштана конского (Рисунок 13, В – Д).

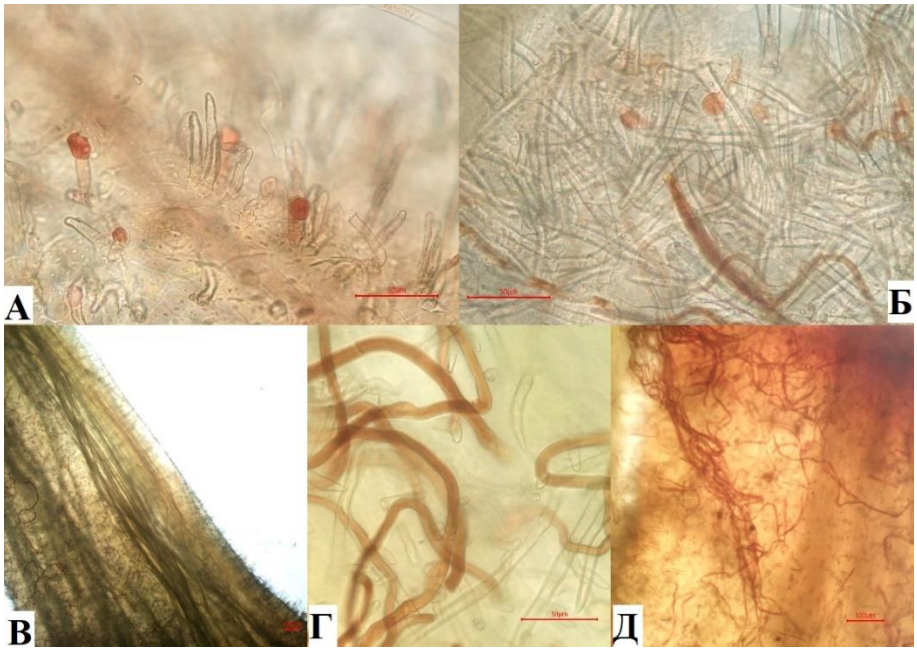


Рисунок 13 – Анатомическое исследование цельного цветка каштана конского: А – головчатый волосок на поверхности листка чашечки, ув.х400; Б – головчатый волосок и извилистая бурая трихома на поверхности цветоножки, ув.х400; В – многочисленные длинные извилистые бурые трихомы на поверхности цветоноса, ув.х40; Г – извилистые бурые многоклеточные трихомы цветоноса, ув.х400; Д – скопление пигментированных извилистых трихом цветоноса, ув.х100

Поверхность тычиночных нитей покрыта вытянутыми клетками эпидермиса и многочисленными одноклеточными трихомами (Рисунок 14, А – Б). Эпидермальные клетки пыльника имеют чешуевидную форму (Рисунок 14, В). На поверхности пыльника встречаются многоклеточные и одноклеточные грубобородавчатые трихомы (Рисунок 14, Г).

К диагностическим признакам анатомического строения измельченных цветков каштана конского следует отнести наличие крупных, слегка вытянутых, многоугольных или округлых клеток эпидермиса, стенки которых имеют заметное утолщение. Визуализируются места прикрепления простых одноклеточных трихом (Рисунок 15, Б). На поверхности также видны многочисленные крупные устьица (Рисунок 15). Циклоцитный или кольцеклетный тип устьичного аппарата. Замыкающие клетки устьиц вытянутые, симметричные, почковидной формы (Рисунок 15, А).

Эпидермис опушен простыми, вытянутыми одноклеточными волосками различного размера и многоклеточными волосками с бородавчатой поверхность (Рисунок 16, А). По краю лепестка располагаются более длинные извилистые, которые зачастую, перекручиваются и обламываются (Рисунок 16, Б).

Эпидермис лепестков венчика при люминесцентном анализе (Глава 2, п. 2.2) имеет специфическое яркое свечение. Трихомы по краю венчика и по жилкам длинные и имеют желтовато-зеленое свечение (Рисунок 16, В), трихомы в центральной части лепестка венчика мелкие, имеют слабое желтоватое свечение (Рисунок 17).

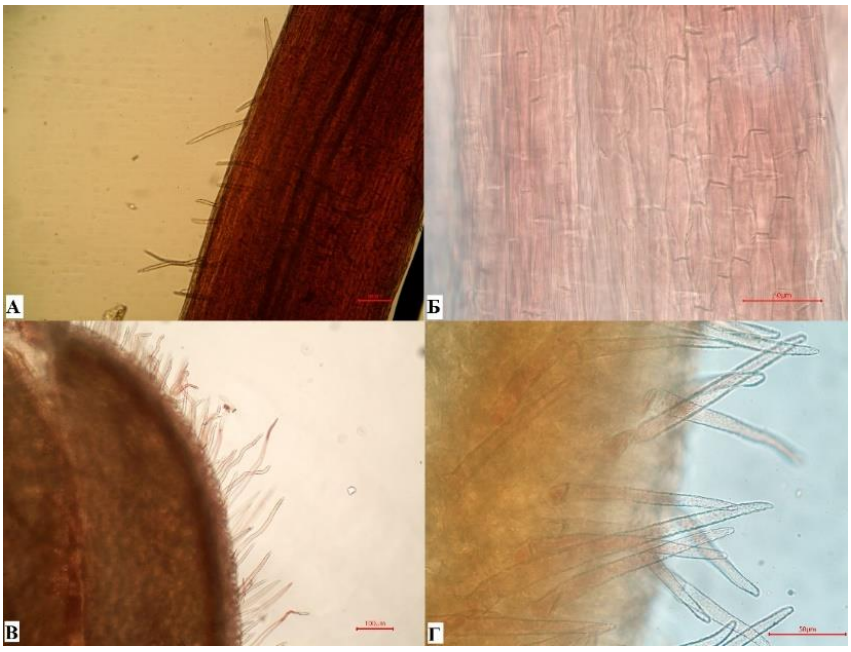


Рисунок 14 – Анатомическое исследование цветка каштана конского: строение тычинки: А – ув.х100; Б – ув.х400; строение пыльника: В – ув.х100; Г – ув.х400

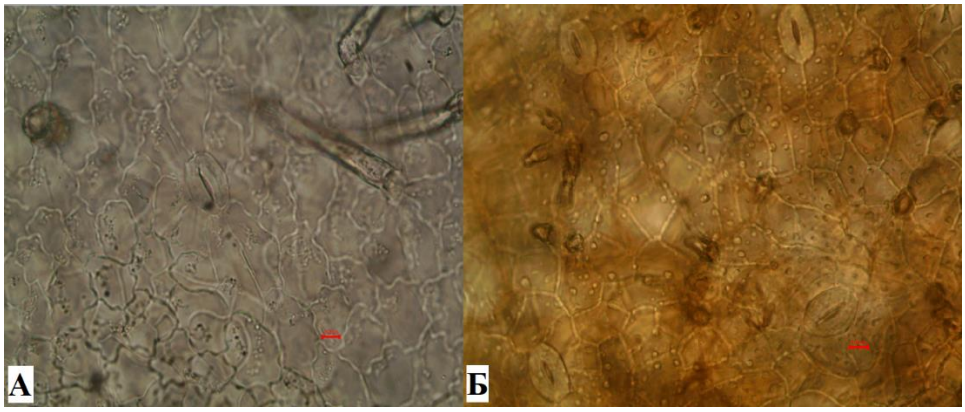


Рисунок 15 – Вид эпидермиса измельченных цветков каштана конского: А – устьица, ув.х400; Б - трихомы и эпидермальные клетки, ув.х400

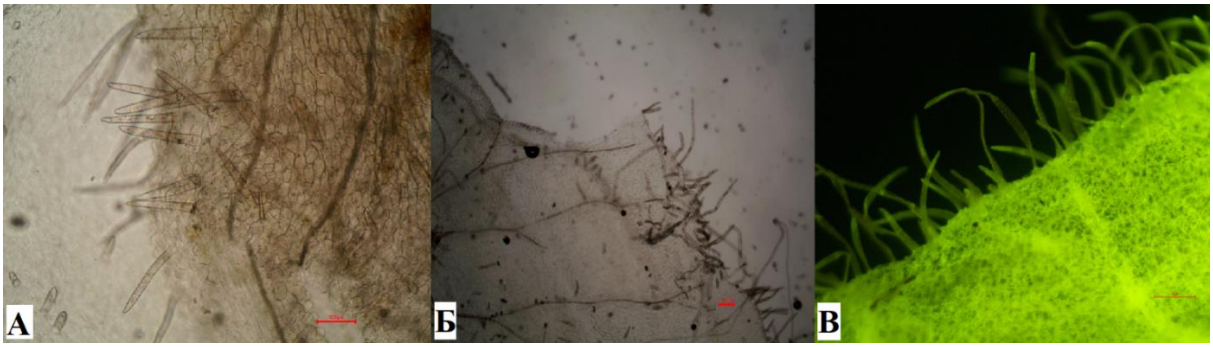


Рисунок 16 – Вид волосков эпидермиса измельченных цветков каштана конского: А – вытянутые бородавчатые волоски и эпидермальные клетки, ув.х100; Б – извилистые краевые волоски ув.х40; В – характер люминесценции трихом по краю венчика ув.х100

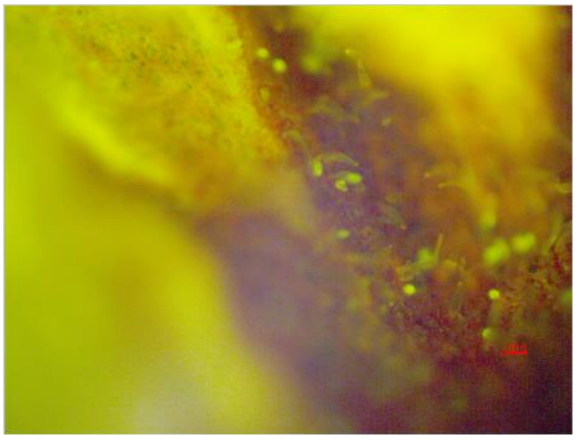


Рисунок 17 – Люминесценция трихом в центральной части лепестка венчика цветка каштана конского (верхняя сторона), ув.х100

Периферия венчика обладает оранжево-желтым свечением, в центре лепестка наблюдается зона, имеющая красно – фиолетовое свечение, предположительно, обеспечиваемое антоциановыми соединениями, локализованными в этой зоне (Рисунок 18, А). Проводящие пучки, располагающиеся по жилкам, имеют ярко – желтое свечение, что особенно отчетливо наблюдается снизу лепестка (Рисунок 18, Б).

В измельченном микропрепарате также визуализируется проводящая система органа. Она представлена сосудами преимущественно спирального типа (Рисунок 19).

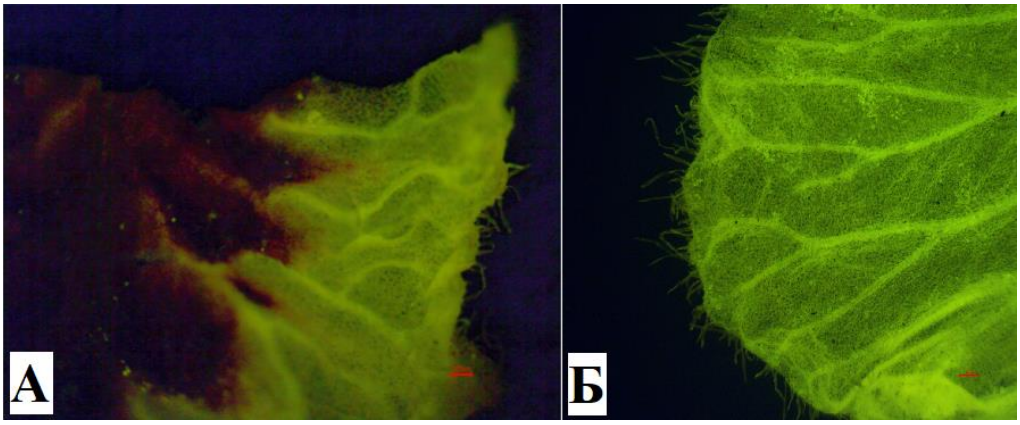


Рисунок 18 – Характер люминесценции венчика: А – Люминесценция тканей лепестка венчика цветка каштана конского (верхняя сторона), ув.х40; Б – Люминесценция проводящих пучков лепестка венчика цветка каштана конского (нижняя сторона), ув.х40

На поверхности листка чашечки при анализе измельченного сырья визуализированы многочисленные простые одноклеточные и многоклеточные волоски с грубобородавчатой структурой поверхности, а также многочисленные устьица и единичные головчатые трихомы (Рисунок 20, А).

Листки чашечки имеют очень яркое свечение желтого цвета, жилки люминесцируют зеленоватым светом, трихомы отчетливо заметны и также имеют желтую люминесценцию (Рисунок 20, Б).

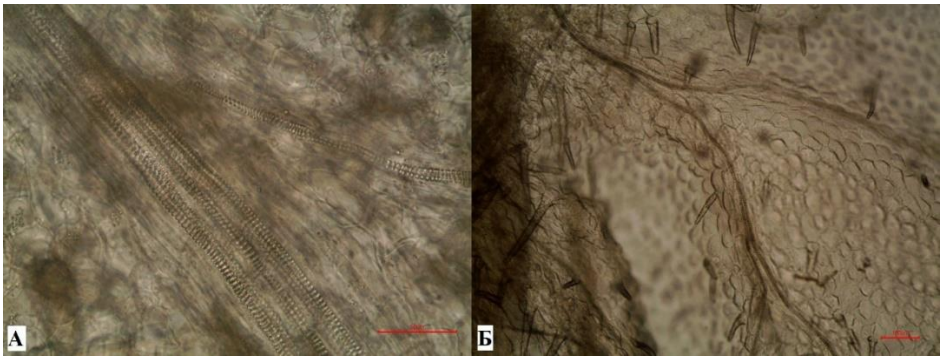


Рисунок 19 – Вид проводящей системы измельченных цветков каштана конского, А - ув.х400; Б - ув.х100

Тычиночные нити и пыльники имеют аналогичный характер свечения (Рисунок 21, А и Б). Пыльцевые зерна люминесцируют свечением лимонного цвета.

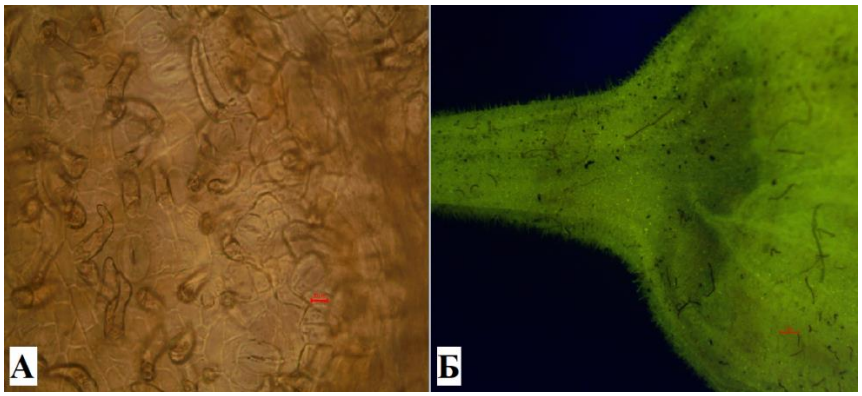


Рисунок 20 – Анатомическое исследование измельченного цветка конского каштана: А – чашечка (устьица, мелкие трихомы и эпидермальные клетки), ув.х400; Б – люминесценция тканей чашечки цветка каштана конского, ув.х40

При микродиагностическом исследовании препарата порошка также отмечены характерные анатомические особенности. Так, на микропрепарате визуализируются обрывки эпидермиса с многоугольными, вытянутыми эпидермальными клетками, с утолщёнными клеточными стенками, а также устьица, окруженные несколькими радиально-симметричными клетками (Рисунок 22).

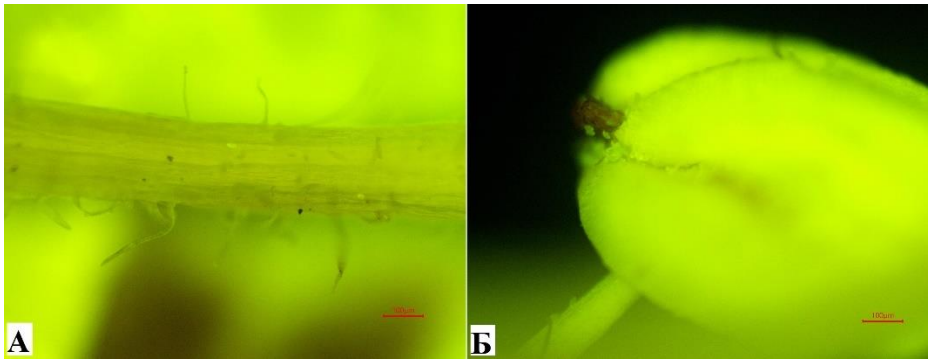


Рисунок 21 – Характер люминесценции: А – тычиночные нити, ув.х100; Б – пыльники, ув.х100

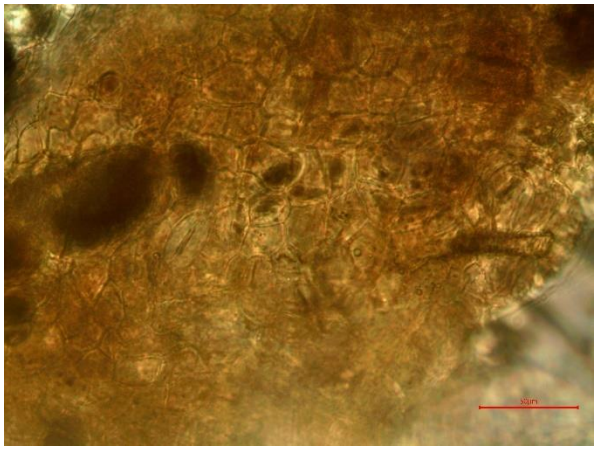


Рисунок 22 – Вид обрывка эпидермиса цветка каштана конского (порошок): устьица и эпидермальные клетки, ув.х400

В порошке определяются также многочисленные простые волоски различной длины и формы: вытянутые, изогнутые и перекрученные (Рисунок 23).

Следует еще раз отметить, что анатомо-диагностические признаки сопоставимы для цельного, измельченного и порошкованного сырья.

Таким образом, в результате проведенной работы были выявлены основные анатомо-диагностические признаки цветков каштана конского, соответствующие цельному, измельченному и порошкованному сырью. Кроме того, были установлены Числовые показатели, а также частота встречаемости выявленных признаков (Таблица 13) [41].



Рисунок 23 – Вид многочисленных простых волосков цветка каштана конского (порошок), ув.х100

Таблица 13 – Числовые характеристики основных установленных анатомо-диагностических признаков цветков каштана конского

Признак	Длина (мкм)	Вариабельность размера признака (мкм)	Ширина (мкм)	Вариабельность размера признака (мкм)
Трихомы венчика	151,08	от 40,48 до 714,0	17,98	от 10,17 до 29,28
Трихомы чашечки	87,85	от 378,21 до 15,88	9,70	от 3,27 до 16,25
Устьица чашечки	22,42	от 15,26 до 41,17	28,95	от 15,07 до 39,84
Эпидермальные клетки венчика	41,09	от 19,96 до 64,72	37,40	от 21,60 до 56,12

Данные по частоте встречаемости диагностических признаков, а также значение устьичного индекса представлены в Таблице 14.

Таблица 14 – Сводные данные значений частоты встречаемости диагностических признаков и устьичный индекс

№ п/п	Признак	Среднее значение частоты встречаемости (n = 6)	Размах варьирования признака
1	Устьица чашечки	2,52	от 0,16 до 6,42
2	Одноклеточные трихомы	10,82	от 0,07 до 64,22
3	Многоклеточные трихомы	0,95	от 0,01 до 1,84
6	Эпидермальные клетки венчика	69,13	от 2,12 до 154,12
7	Устьичный индекс	2,48	от 0,15 до 5,9

На основании проведенного микроскопического исследования были идентифицированы и охарактеризованы анатомо-диагностические признаки цветков каштана конского, позволяющие достоверно устанавливать подлинность изучаемого ЛРС в цельном, измельченном и порошкованном сырье.

3.3. Растровая электронная микроскопия цветков каштана конского

Одним из передовых методов, последнее время всё чаще используемых в медицине и практике фармакогностического анализа, является растровая электронная микроскопия (РЭМ) [48]. Данный оптический метод позволяет изучать поверхность различных исследуемых образцов, в частности и ЛРС, включая встречающиеся на ней морфолого-анатомические структуры с высоким разрешением. В отличие от традиционной световой микроскопии метод даёт возможность получить объёмное пространственное представление о диагностически значимых признаках изучаемого ЛРС [48]. Однако стоит отметить, что в настоящее время данный метод не является фармакопейным в части анализа ЛРС. В случае оценки подлинности ЛРС метод применим только для исследования цельного сырья и не позволяет выявить диагностически значимые признаки для измельчённого и порошкованного сырья, что следует отнести к его недостаткам [48].

Для сравнения выявленных особенностей строения изучаемого сырья проводили сопоставление данных с фармакопейным методом идентификации ЛРС – световой микроскопией, примененной выше в п. 3.2. данной главы. Особенности пробоподготовки представлены в п. 2.2. Главы 2. Микрофотографии, полученные в ходе анализа, демонстрируют особенности морфологии поверхности цветков каштана конского в объемном изображении (Рисунок 24–30) [48].

Поверхность исследуемых образцов в результате высушивания приобрела специфический рельеф. Эпидермальные клетки лепестков венчика многоугольные, неправильной формы, некоторые вытянутые, с извилистыми складками. Клеточные стенки имеют утолщения (Рисунок 24, А и Б).

Пробоподготовка к проведению анализа методом световой микроскопии приводит к исчезновению морщинистого рельефа поверхности (Рисунок 24, В).

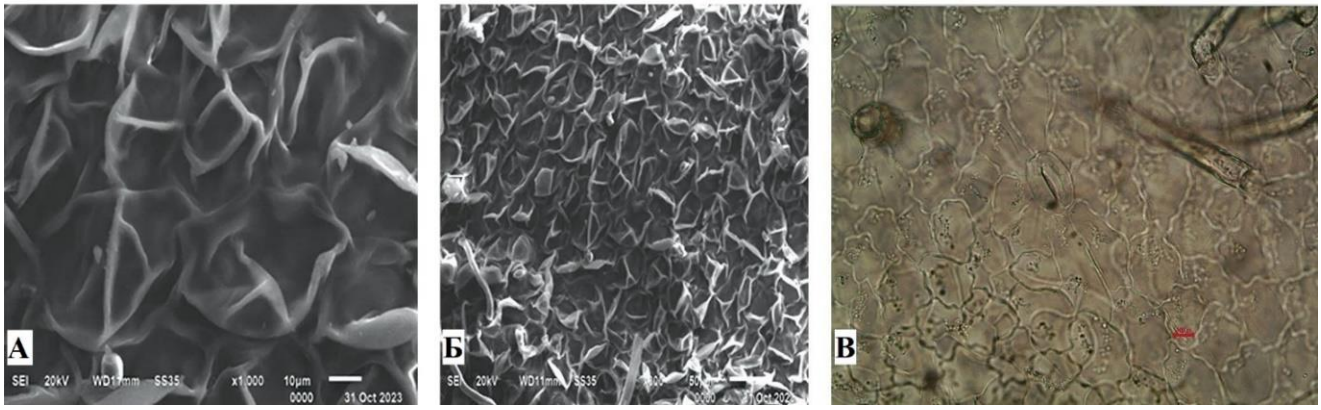


Рисунок 24 – Фрагмент эпидермиса венчика цветка каштана конского. РЭМ: эпидермальные клетки венчика цветка каштана конского, А – (ув. ×1000); Б – (ув. ×300); В – световая микроскопия (ув. ×400)

На изучаемых образцах в большом количестве визуализируются трехбороздно-поровые пыльцевые зерна эллипсоидально-продолговатой формы с широкими бороздам, экзина зернисто-струйчатая, мембраны апертур покрыты шипиками, очертание с полюса преимущественно округлое, с экватора – эллиптическое [83]. Пыльцевые зерна могут быть собраны в гроздеобразные скопления, располагаться разрозненно или встречаться поодиночке (Рисунок 25, А – В). Поверхность лепестка венчика покрыта многочисленными волосками, имеющими грубобородавчатую структуру и конусовидное основание с четко выраженным местом крепления (Рисунок 26, А и Б).

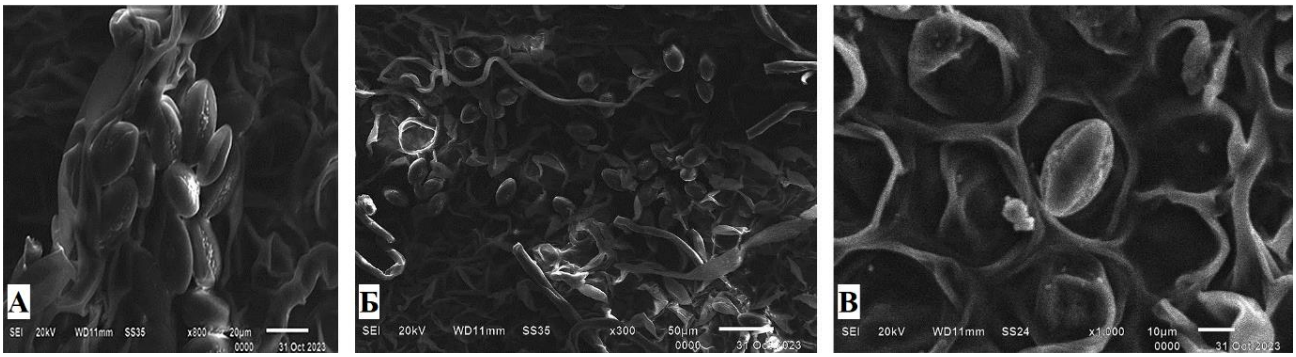


Рисунок 25 – Пыльцевые зерна: А – сгруппированные пыльцевые зерна и эпидермальные клетки цветка конского каштана (ув. ×800); Б – разрозненно расположенные пыльцевые зерна цветка конского каштана (ув. ×300); В – единично расположенное пыльцевое зерно (ув. ×1000)

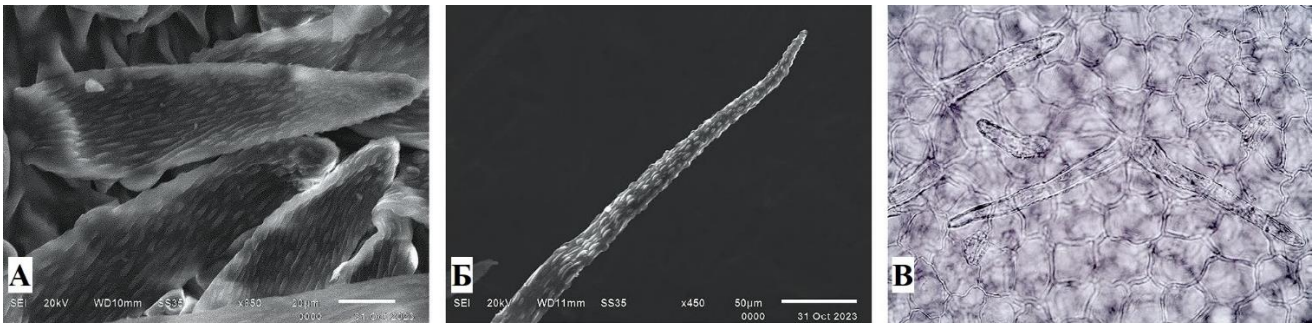


Рисунок 26 – Грубобородавчатые волоски поверхности лепестка венчика цветка каштана конского. РЭМ: А – (ув. ×850); Б – (ув. ×450); В – световая микроскопия (ув. ×400)

Волоски имеют различную длину, наиболее крупные и извилистые располагаются по краю лепестка венчика (Рисунок 27, А). Трихомы на поверхности лепестка часто перекручиваются, переплетаются между собой и могут обламываться (Рисунок 27, Б). РЭМ с применением увеличения в 800 и более раз позволяет визуализировать шероховатую поверхность трихом данного сырья.

В результате изучения тычиночных нитей были отмечены характерные особенности поверхности: эпидермальные клетки не дифференцированы, поверхность тычиночных нитей бороздчатая, с продольными складками, что более четко можно увидеть на микрофотографии, полученной методом РЭМ (Рисунок 28, А). На поверхности встречаются единичные одноклеточные волоски с грубобородавчатой структурой (Рисунок 28).

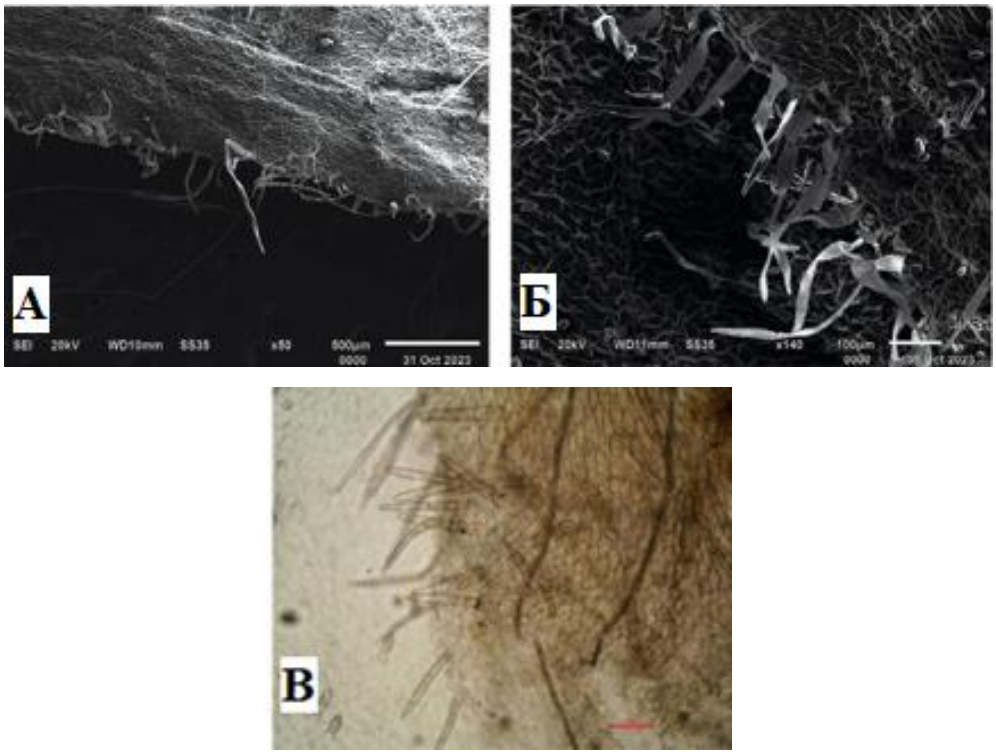


Рисунок 27 – Краевые волоски лепестка венчика цветка каштана конского. РЭМ: А – (ув. ×50); Б – переплетенные волоски лепестка венчика каштана конского (ув. ×140); В – световая микроскопия (ув. ×100)

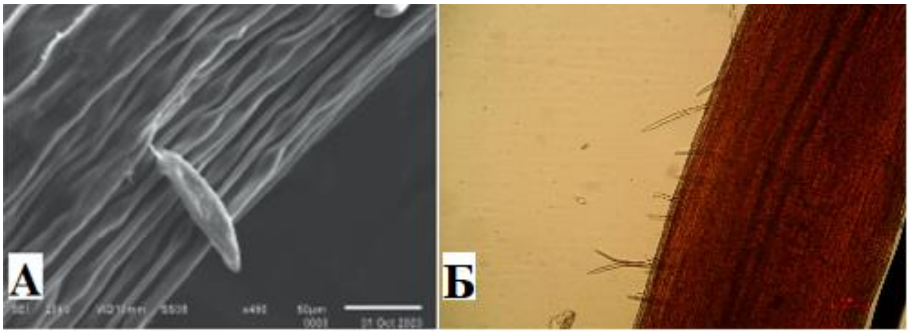


Рисунок 28 – Бороздчатость поверхности тычиночных нитей цветка каштана конского. РЭМ: А – (ув. ×450); Б – световая микроскопия (ув. ×100)

Также были изучены морфологические особенности поверхности пыльника цветков каштана конского. Пыльник обладает складчатой формой, его поверхность выстилают чешуйчатые эпидермальные клетки с грубыми и утолщенными стенками. На поверхности пыльника визуализируются многочисленные пыльцевые зерна (Рисунок 29, А и Б).

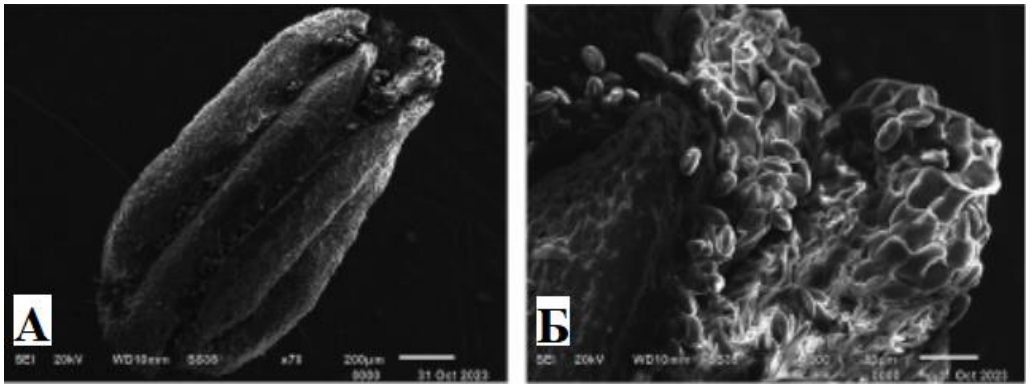


Рисунок 29 – Морфология поверхности пыльника цветка каштана конского: А – полноразмерный пыльник цветка каштана конского (ув. ×70); Б – чешуйчатые клетки пыльника и пыльцевые зерна (ув. ×300)

Поверхность чашечки, включая цветоножку, также густо опушена многочисленными трихомами (Рисунок 30).

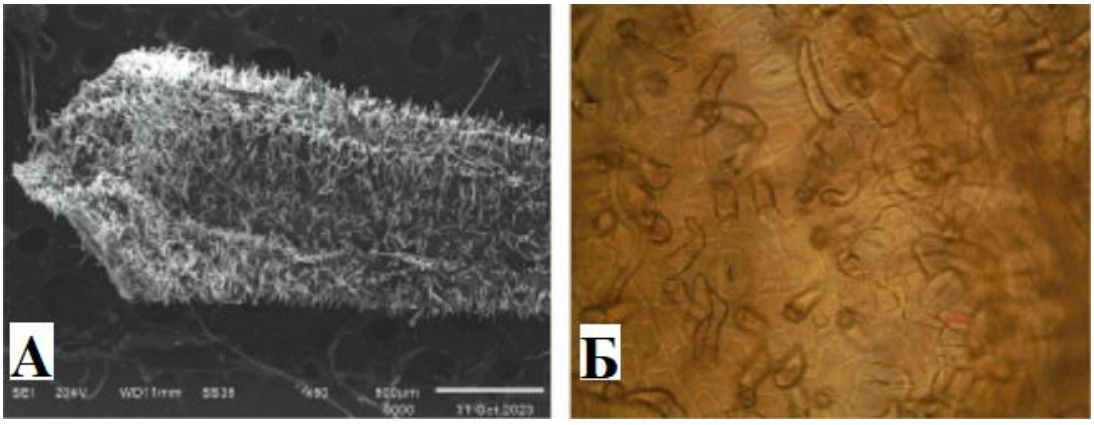


Рисунок 30 – Морфология поверхности цветоножки цветка каштана конского. РЭМ: А – (ув. ×50); Б – световая микроскопия (ув. ×400)

Сплошное покрытие эпидермиса волосками затрудняет визуализацию иных диагностических характеристик данной структуры цветка, например, размера и формы клеток, методом РЭМ.

3.4. Определение показателей качества цветков каштана конского

Для научного обоснования числовых значений показателей качества ЛРС, включаемых в НД, необходимо изучать их зависимость от условий произрастания во всех регионах РФ, где широко культивируется производящее растение. В

соответствии с требованиями ГФ РФ XV, были определены показатели доброкачественности цветков каштана конского для разработки раздела «Испытания» проекта ФС для ГФ РФ (Таблица 15). В сырье определяли влажность, золу общую, золу, нерастворимую в хлористоводородной кислоте (Глава 2, п. 2.3). Установлено, что максимальное содержание общей золы (8,36±0,29%) и наибольшее количество минеральных примесей (0,61±0,11%), отражающих, в том числе накопление в сырье тяжелых металлов, было характерно для цветков каштана конского, заготовленных в Воронежской области (г. Воронеж). Количество золы, нерастворимой в 10% растворе HCl, в сырье, произрастающем на территории г. Воронеж, почти в три раза больше, чем в цветках, собранных в районе г. Пятигорск [44]. Это может свидетельствовать о высокой антропогенной нагрузке в данном регионе и загрязненности почв солями тяжелых металлов. Размах варьирования показателей для изучаемого сырья составлял от 5,66 до 8,36% и от 0,20 до 0,61% для золы общей и нерастворимой в 10% растворе HCl соответственно.

Таблица 15 – Результаты определения числовых показателей образцов сырья

№ п/п	Регион заготовки	Зола нерастворимая в 10% растворе HCl, %	Зола общая, %	Влажность, %
1	Волгоградская область	0,48±0,06	6,45±0,10	12,20±0,07
2	Ленинградская область	0,44±0,17	7,23±0,07	11,40±0,28
3	Московская область	0,27±0,08	5,66±0,03	11,70±0,07
4	Ставропольский край	0,20±0,06	6,75±0,24	10,80±0,14
5	Воронежская область	0,61±0,11	8,36±0,29	10,50±0,21
6	Петрозаводский городской округ	0,38±0,02	6,60±0,03	11,60±0,23
7	Рекомендуемое значение показателя для проекта ФС, %	Не более 2	Не более 10	Не более 14

По результатам эксперимента установлены рекомендуемые нормативы критериев доброкачественности изучаемого сырья для раздела «Испытания» проекта ФС для ГФ РФ.

Опираясь на опыт коллег: «разрабатывали также разделы для проекта ФС на данное ЛРС «Измельчённость сырья» и «Посторонние примеси»» [84, 134]. Рекомендованы их числовые критерии для включения в проект ФС «Конского каштана обыкновенного цветки» для ГФ РФ (раздел «Испытания»):

- Цельное сырьё: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм - не более 5 %;

- Измельчённое сырьё: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм - не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм – не более 5 %;

- Порошок: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм - не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм - не более 5 %;

- «Ветки и другие части растения» (в том числе отделенные при анализе). Цельное и измельченное сырье – не более 1 %;

- «Цветки, поврежденные вредителями». Цельное и измельченное сырье – не более 2 %;

- «Цветки, изменившие окраску (пожелтевшие, потемневшие)». Цельное и измельченное сырье – не более 2 %.

Усреднённые по регионам заготовки показатели содержания минеральных и органических примесей в цветках каштана конского составили 0,25±0,02 % и 0,57±0,05 % соответственно. Исходя из этих данных, для включения в проект ФС были предложены следующие нормативы:

- «Органическая примесь». Цельное и измельченное сырье – не более 1 %;

- «Минеральная примесь». Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 1 %.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. В результате сравнительного макро- и микроскопического анализа цветков каштана конского обыкновенного, были выявлены основные морфологические и анатомо-диагностические признаки, позволяющие определить

подлинность цельного, измельченного и порошкованного сырья. Установлены числовые показатели анатомо-диагностических признаков сырья. Характерными признаками для сырья всех изученных регионов произрастания являлись:

- для лепестка венчика: наличие крупных, слегка вытянутых, многоугольных или округлых клеток эпидермиса, клеточные стенки имеют четко заметные утолщения; многочисленные простые волоски различного размера по краю лепестка, состоящие из одной или нескольких клеток с грубобородавчатой поверхностью; места прикрепления волосков в виде овальных образований; проводящая система представлена сосудами с разным типом утолщения – спиральным и ленточным;

- для листков чашечки: на поверхности большое количество простых одноклеточных извилистых трихом, которые зачастую перекручиваются и обламываются; многочисленные простые одноклеточные вытянутые и многоклеточные волоски, поверхность которых имеет грубобородавчатую структуру; крупные устьица (циклоцитный или кольцеклетный тип); проводящая система чашечки представлена сосудами преимущественно спирального типа.

- поверхность тычиночных нитей покрыта вытянутыми клетками эпидермиса и многочисленными одноклеточными трихомами;

- поверхность цветоножки покрыта множеством одноклеточных и многоклеточных трихом различного размера с грубобородавчатой поверхностью

2. При проведении люминесцентного анализа впервые выявлены особенности флуоресценции цветков каштана конского обыкновенного. Эпидермис лепестков венчика при люминесцентном анализе имеет специфическое яркое свечение; периферия венчика обладает оранжево-желтым свечением; трихомы по краю венчика и по жилкам имеют желтовато-зеленое свечение, трихомы в центральной части лепестка венчика имеют слабое желтоватое свечение; проводящие пучки - ярко – желтое свечение, что особенно отчетливо наблюдается снизу лепестка. Листки чашечки имеют очень яркое свечение желтого цвета, жилки люминесцируют зеленоватым светом, трихомы отчетливо заметны и также имеют желтую люминесценцию. Тычиночные нити и

пыльники имеют аналогичный характер свечения. Пыльцевые зерна люминесцируют лимонного цвета свечением;

3. Метод растровой электронной микроскопии впервые использован для изучения морфолого-анатомических признаков цветков каштана конского. Уточнено строение основных диагностически значимых структур данного ЛРС. Определена морфология поверхности эпидермиса лепестков венчика и листков чашечки, трихом, пыльцевых нитей, пыльников и пыльцевых зерен цветков. Полученные сведения дополняют и дают представление об объемном характере данных, полученных при исследовании цветков каштана конского фармакопейным методом световой микроскопии.

4. Определены некоторые числовые показатели качества цветков каштана конского обыкновенного, заготовленных в различных регионах РФ. Изучена региональная изменчивость данных характеристик доброкачественности сырья. Согласно полученным результатам, предложены критерии для показателей: влажность - не более 14%; зола общая - не более 10%; зола, нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной - не более 2%; ветки и другие части растения (в том числе отделенные при анализе) - не более 1 %; цветки, поврежденные вредителями - не более 2 %; цветки, изменившие окраску (пожелтевшие, потемневшие) – не более 2%; органическая примесь - не более 1 %; минеральная примесь - не более 1% (Приложение 1);

5. Проект фармакопейной статьи «Конского каштана обыкновенного цветки» для ГФ РФ (Приложение 1) базируется на полученных результатах исследований, которые легли в основу разделов «Внешние признаки», «Микроскопия» и «Испытания».

ГЛАВА 4. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЦВЕТКОВ КАШТАНА КОНСКОГО

В РФ осуществляется сбор ЛРС от дикорастущих растений в районах, удалённых от промышленных источников загрязнения. В методических указаниях по сбору и сушке ЛРС рекомендуется избегать заготовки сырья в городской черте, а также вблизи автомобильных дорог и промышленных предприятий. При этом конкретные ограничения по расстоянию от источников промышленного загрязнения не указываются. По этой причине особую важность приобретают показатели, которые характеризуют безопасность ЛРС. Биологическая активность лекарственного растительного сырья угнетается тем сильнее, чем выше уровень депонирования фитотоксикантов внутри клеток. Среди последних: кадмий, свинец, ртуть и прочие представители группы тяжёлых металлов. Они могут проникать в ассимиляционные органы как через устьично-кутикулярный барьер из аэрозольных взвесей и газопылевых выбросов так и через корневую систему, ее ризосферу из почвы. Эти элементы способны превращаться в химически активные формы и, обладая высокой токсичностью, могут вступать в биохимические циклы, накапливаться в организме человека и даже в малых дозах оказывать влияние на физиологические процессы. Негативное влияние тяжелых металлов на живые организмы и здоровье человека проявляется не только в прямом воздействии высоких концентраций, но и в отдаленных последствиях, связанных с их кумулятивным эффектом. При продолжительном употреблении лекарственных средств, содержащих тяжелые металлы, возможно развитие неспецифической патологии.

Для оценки возможности использования перспективного ЛРС, произрастающего на антропогенно измененных территориях, необходимы исследования по их гигиенической безопасности, в частности заражении искусственными радионуклидами (стронций-90, цезий-137). Воронежская область является одним из районов радиоактивного загрязнения, связанного с аварией на Чернобыльской атомной электростанции в 1986 году. Ее последствия откликаются и сегодня. Спустя 40 лет, радионуклиды активно накапливаются в

растениях, проникая из почвы через корни, и поэтому могут быть обнаружены в ЛРС и ЛРП на его основе. В нормативном поле на территории РФ существуют закрепленные в ГФ XV нормы: «регламентирующие содержание в ЛРС тяжелых металлов (ОФС.1.5.3.0009), радионуклидов (ОФС.1.5.3.0001) и пестицидов (ОФС.1.5.3.0011)» [26].

В целях контроля безопасности ЛРС, в цветках каштана конского, на примере сырья, заготовленного на территории Воронежской области, было определено: «содержание тяжелых металлов, радионуклидов и остаточных пестицидов с использованием известных методик» [181].

4.1. Элементный состав цветков каштана конского на примере сырья, заготовленного на территории Воронежской области

«Минеральный состав исследуемых объектов изучали методом хромато-масс-спектроскопии с индуктивно связанной плазмой с использованием системы «ELAN-DRC»» [181], как описано в Главе 2, п. 2.4.

В результате проведенного исследования, в изучаемых объектах было установлено наличие 64 элементов в почве и 58 в сырье. Полученные данные представлены в Таблице 16. Необходимо отметить, что цветки каштана конского содержат достаточно большое количество макроэлементов – 98,83% всего элементного состава (Рисунок 31).

Среди макроэлементов преобладает кальций (15114,44 мкг/г) и калий (13020,18 мкг/г), в меньшей степи в цветках содержится фосфор (6760,06 мкг/г). Если выстроить ряд макроэлементов в порядке убывания, то выходит следующее: кальций > калий > фосфор > магний > натрий. Рассчитав коэффициенты биологического поглощения (Кбп), стало очевидным, что цветки каштана конского имеют достаточно высокую способность к аккумуляции макроэлементов, в частности фосфора. Менее эффективно аккумулируется в цветках калий и кальций. Среди макроэлементов меньше всего в данном виде ЛРС накапливается натрий (Таблица 16). Микроэлементы составляют лишь 1,16% общего минерального комплекса. Преобладающим элементом в этой группе оказался кремний (129,0 мкг/г). Цветки каштана показали умеренную способность

к аккумуляции микроэлементов из почвы. Значения коэффициента накопления в группе варьируют от 0,001 до 1,08 [181].

Таблица 16 – Элементный состав цветков каштана конского и почвы с места заготовки ЛРС

№п/п	Элемент	Цветки каштана, мкг/г	Почва, мкг/г	Кбп
	1	2	3	4
Макроэлементы				
1	Натрий	195,24	3600	0,05
2	Магний	1279,55	4500	0,28
3	Фосфор	6760,06	610	11,08
4	Калий	13020,18	9800	1,33
5	Кальций	15114,44	14 200	1,06
Общее количество		*36369,47*	*32710*	-
Микро – и ультрамикроэлементы				
6	Кремний*	129	359000	0,0004
7	Алюминий	123,19	31000	0,04
8	Железо *	24,8	17400	0,001
9	Стронций	49,24	67	0,73
10	Марганец*	40,4	390	0,1
11	Цинк*	36,37	140	0,26
12	Титан	4,7	2200	0,002
13	Барий	6,01	260	0,23
14	Рубидий	3,6	53	0,07
15	Хром*	3,07	36	0,08
16	Медь *	3,41	21	0,16
17	Ванадий *	0,39	7,2	0,05
18	Литий*	0,88	19	0,05
19	Молибден*	1,08	1	1,08
20	Никель*	0,47	19,5	0,02
21	Селен *	0,72	6,97	0,1
22	Цирконий	следы	84	0
23	Олово	следы	2,3	0
24	Кобальт*	0,16	7	0,02
25	Скандий	следы	следы	0
26	Иттрий	0,02	12	0,002
27	Галлий	0,02	9,4	0,002
28	Ниобий	0,01	5,9	0,002
29	Сурьма	0,01	0,47	0,02
30	Торий	0,007	5,4	0,001
31	Цезий	0,01	2,3	0,004
32	Уран	0,008	0,97	0,008
33	Германий	следы	1,3	0
34	Висмут	0,001	0,21	0,005
35	Таллий	0,004	0,28	0,14
36	Бериллий	следы	0,91	0
37	Гафний	следы	2,3	0

Продолжение таблицы 16

38	1	2	3	4
	Тантал	следы	0,39	0
39	Вольфрам	следы	0,91	0
40	Золото	следы	0,09	0
41	Серебро	-	следы	-
42	Теллур	-	следы	-
43	Платина	-	следы	-
Общее количество	*427,58*	*410626,8*	-	
Токсичные элементы				
44	Свинец	1,44	18	0,08
45	Ртуть	0,004	0,09	0,04
46	Мышьяк	0,08	следы	-
47	Кадмий	0,008	0,43	0,02
Лантаноиды				
48	Лантан	0,02	19	0,001
49	Церий	следы	40,2	0
50	Празеодим	0,01	4,4	0,002
51	Неодим	0,03	17	0,002
52	Самарий	следы	3,3	0
53	Европий	следы	0,66	0
54	Гадолиний	следы	3,2	0
55	Тербий	следы	0,43	0
56	Диспрозий	следы	2,3	0
57	Гольмий	следы	0,39	0
58	Эрбий	следы	1,3	0
59	Тулий	следы	0,19	0
60	Иттербий	следы	1,1	0
61	Лютеций	следы	0,15	0
62	Рутений	-	следы	-
63	Индий	-	следы	-
64	Рений	-	следы	-

*-эссенциальные микроэлементы

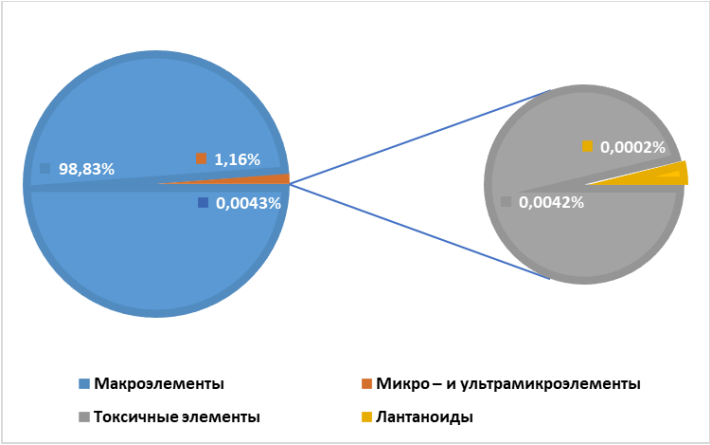


Рисунок 31 – Соотношение групп элементов в цветках каштана конского

Содержание нормируемых тяжелых металлов и мышьяка в цветках каштана конского соответствует требованиям НД. В наибольшей степени в цветках накапливается свинец (коэффициент накопления 0,08). Остальные элементы аккумулировались в изучаемом ЛРС неактивно.

Рассчитав коэффициенты накопления элементов в ЛРС и классифицируя их по Перельману, установили, что цветки каштана конского имеют достаточно высокую способность к аккумуляции макроэлементов, в частности Р (элемент энергичного накопления). Менее эффективно аккумулируется в цветках К, Са и Мо (элементы сильного накопления). Na, Al, Rb, Cr, V, Li, Ni, Co, Sb относятся к элементам слабого захвата. Такие элементы как Mg, Sr, Mn, Zn, Ba, Se и Ta относятся к группе слабого накопления и среднего захвата. Остальные обнаруженные минеральные компоненты принадлежат группе слабого накопления и очень слабого захвата (Рисунок 32) [181]. В таблице 16 представлены средние значения (n=3).

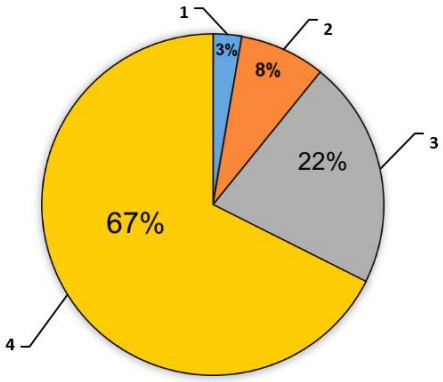


Рисунок 32 – Распределение элементов в цветках каштана конского по классификации А.И. Перельмана (по Кбп) [181]: 1 – Доля элементов энергичного накопления (Р); 2 – сильного накопления (Са, К, Мо); 3 – слабого накопления и среднего захвата; 4 – слабого накопления и очень слабого захвата

В растительном сырье и почвах с места культивирования растения были обнаружены элементы, содержащиеся в следовых количествах (бериллий, гафний, тантал, вольфрам, золото, самарий, европий, гадолиний, тербий, диспрозий, гольмий, эрбий, тулий, иттербий, лютеций). Также в следовых количествах в

почве были обнаружены такие элементы как рутений, индий, серебро, теллур, рений и платина, в цветках каштана эти элементы обнаружены не были [181].

Изучаемое растительное сырье соответствует требованиям ГФ РФ, установленным в отношении значений допустимых концентраций тяжелых металлов и мышьяка [26]. Установлено, что цветки каштана конского накапливают значительное количество макроэлементов (фосфора, калия, кальция и т.д) [134]. Однако, наряду с активным накоплением макроэлементов наблюдается и достаточно низкая накопительная активность по отношению к микроэлементам. Среди микроэлементов в цветках каштана в наибольшем количестве содержится кремний. Для цветков конского каштана характерно отсутствие кумулятивного эффекта в отношении катионов поллютантов, поскольку уровень содержания тяжелых металлов в растении уступает почвенному фону места произрастания [181].

4.2. Определение в цветках каштана конского радионуклидов

«Для целей анализа использовали цветки каштана конского, заготовленные в Воронежской области в 2023 году» [49]. Область сбора образцов обусловлена особенностями антропогенного воздействия в условиях городской среды и рядом расположенной (г. Нововоронеж) атомной электростанции, также Воронежская область расположена на радиоактивно загрязненных территориях, вследствие аварии на АЭС (г. Чернобыль, Восточная Украина, 1986 г.) [88]. Определение содержания искусственных радионуклидов в ЛРС проводили с использованием спектрометра-радиометра МКГБ-01 «РАДЭК» по стандартной фармакопейной методике (Глава 2 п. 2.5) [49]. Результаты определения активности радионуклидов в исследуемых цветках каштана конского приведены в Таблице 17.

Таблица 17 – Активность радионуклидов в образцах цветков каштана конского обыкновенного

№ п/п	Радионуклид	Фактическое значение показателей активности Бк/кг	Норматив показателя [26, 84]
	1	2	3

Продолжение таблицы 17

1	1	2	3
	Цезий - 137	< 3	Не более 400
2	Стронций - 90	< 1	Не более 200

Фактическим значением характеристик по результатам испытаний является: «число, которое является нижним пределом количественного определения методики (прибора), предусмотренным НД на метод испытаний» [21, 22, 84]. Результаты анализов цветков каштана конского обыкновенного, заготовленного на территории Воронежской области, показали полное соответствие данного сырья требованиям ФС по содержанию искусственных радионуклидов [26].

4.3. Определение в цветках каштана конского остаточных пестицидов

К факторам антропогенного воздействия на окружающую среду также относится использование пестицидов [26]. В частности, Воронежская область представляет собой крупный промышленно-аграрный регион, где функционируют сельскохозяйственные предприятия, широко использующие пестициды. Остаточные количества пестицидов и загрязнение почвы токсикантами негативно влияют на качество и экологическую безопасность ЛРС [88]. В качестве объекта исследования использовали сырье, заготовленное на территории Воронежской области в 2024 году. Определение содержания остаточных пестицидов в ЛРС проводили согласно известной фармакопейной методике (Глава 2 п. 2.6) [26]. Результаты определения представлены в Таблице 18 и на Рисунке 33.

Таблица 18 – Содержание пестицидов в цветках каштана конского обыкновенного (n=3)

Наименование определяемых показателей	Содержание в сырье, мг/кг	Предельно допустимое содержание, мг/кг [26]
ГХЦГ (α-, β-, γ- изомеры)	0,0103	0,1
ДДТ и его метаболиты	0,0133	0,1

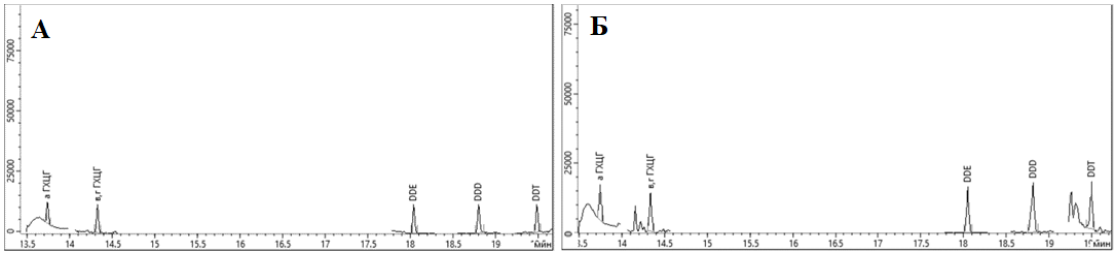


Рисунок 33 – Вид хроматограмм при определении остаточных пестицидов методом ГХ/МС: А – смесь СО пестицидов; Б – извлечение из цветков каштана конского, заготовленных на территории Воронежской области

В ходе анализа установлено, что в заготавливаемом сырье содержание пестицидов не превышает предельно допустимых значений.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. При изучении полного макро- и микроэлементного состава цветков каштана конского обнаружено 58 элементов. К элементам энергичного накопления в цветках каштана конского относится фосфор. К элементам, сильно накапливающимся в растении, следует отнести калий, кальций и молибден. К группе элементов слабого накопления и среднего захвата относятся магний, стронций, марганец, цинк, барий, медь, селен, таллий. Остальные элементы являются элементами слабого накопления и очень слабого захвата. Выявлено, что содержание тяжелых металлов и мышьяка в цветках каштана не превышает установленных нормативов.

2. Показано, что цветки каштана конского не концентрируют в себе активные радионуклиды цезий - 137 и стронций - 90 и соответствует требованиям ФС по содержанию искусственных радионуклидов

3. Установлено, что цветки каштана конского не аккумулируют пестициды. Содержание нормируемых остаточных пестицидов (изомеры ГХЦГ α-, β-, γ-изомеры, а также ДДТ и его метаболиты) не превышало предельно допустимых концентраций, установленных ФС ГФ РФ.

ГЛАВА 5. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦВЕТКОВ КАШТАНА КОНСКОГО

В соответствии с данными опубликованных исследований: «в последние десятилетия наблюдается устойчивый рост интереса к природным источникам БАС, что связано с приоритетной задачей в области модернизации фармацевтической промышленности РФ в части разработки эффективных и безопасных лекарственных средств, а также возрождения собственного растениеводства. В соответствии с существующими тенденциями такие задачи, как поиск новых видов растительного сырья или расширение перечня показаний к применению уже используемого, являются актуальными для современной медицины и фармации. Как показал проведенный нами ранее анализ (Глава 1, п. 1.10), на фармацевтическом рынке РФ присутствуют ЛРП исключительно на основе семян — фармакопейного сырья каштана конского» [4, 63]. «Цветки каштана конского остаются мало исследованными с отдельными фрагментарными данными по химическому составу и видам фармакологической активности» [205, 220, 261], что обусловило актуальность проведенных в данной главе исследований.

5.1. Определение экстрактивных веществ

В свою очередь первичным показателем, дающим информацию, как о качестве, так и о присутствии суммы БАВ в составе метаболома, является содержание экстрактивных веществ в ЛРС.

Экстракцию суммы соединений каштана конского цветков проводили водой очищенной и спиртоводными смесями разного состава [43] для оценки водо- и спирторастворимых фракций БАВ и планирования последующих разработок различных видов ЛФ на основе данного сырья. Вариабельность выхода БАВ в зависимости от использования экстрагентов с различной полярностью оценивалась на примере цветков каштана конского, заготовленного на территории Воронежской области. Результаты отражены в Таблице 19. Определение проводили по соответствующей ОФС (Глава 2, п. 2.7).

Таблица 19 – Содержание экстрактивных веществ в цветках каштана конского (на примере сырья, заготовленного в Воронежской области)

Используемый растворитель	Содержание экстрактивных веществ, в %
Вода очищенная	31,30±0,93
Этанол 20%	33,90±1,01
Этанол 40%	36,80±1,10
Этанол 50%	35,50±1,06
Этанол 70%	35,12±0,70
Этанол 96%	16,50±0,49

Анализируя данные таблицы, видно, что все образцы водно-спиртовых смесей в диапазоне 40-70% дают высокий выход экстрактивных веществ (от 35,12% до 36,8%), формируя плато эффективности. Это позволяет рекомендовать данные растворители для количественного определения экстрактивных веществ в данном виде сырья. Определено содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 40% и 70% спиртом этиловым, в исследуемых образцах цветков каштана конского различных регионов произрастания [44] (Таблица 20).

Таблица 20 – Содержание экстрактивных веществ в цветках каштана конского различных регионов произрастания

№ п/п	Регион заготовки	Содержание экстрактивных веществ, %	
		40% этанол	70% этанол
1	Волгоградская область	45,08±0,29	30,98±0,62
2	Ленинградская область	43,73±0,87	40,76±0,82
3	Московская область	48,96±0,03	48,95±0,98
4	Ставропольский край	38,87±1,20	34,30±0,69
5	Воронежская область	36,8±1,10	35,12±0,7
6	Петрозаводский городской округ	44,38±0,77	47,29±0,95

Согласно полученным результатам, наибольшее значение данного показателя отмечалось у цветков каштана конского, заготовленных в Московской области (г. Москва). В исследуемых регионах заготовки значение показателя изменялось в диапазоне от 30 до 49%, что свидетельствует о высоком содержании гидрофильной фракции БАВ в цветках. Размах варьирования данного показателя обусловлен различными условиями эколого-географического произрастания производящих растений.

На основании проведенных исследований можно рекомендовать включение показателя «Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% спиртом» для сырья, используемого при производстве настоек и экстрактов в проекте ФС «Конского каштана обыкновенного цветки» для ГФ РФ, и установить норматив не менее 25%.

5.2. Качественный анализ биологически активных веществ цветков каштана конского

Извлечения для обнаружения основных групп биологически активных веществ в цветках каштана готовили по методикам, описанным в Главе 2 (п. 2.8). Для установления присутствия основных групп биологически активных веществ в цветках каштана применяли стандартные качественные реакции, описанные в Главе 2 (п. 2.8) [84, 88, 134]. Сводные данные отражены в Таблице 21.

Таблица 21 – Качественный анализ некоторых групп БАВ в цветках каштана конского (на примере сырья, заготовленного в Воронежской области)

Группы БАВ в образцах	Вывод о присутствии
Флавоноиды	+
Сапонины	+ (спирторастворимые сапонины) + (водорастворимые сапонины)
Полисахариды (слизи)	+
Антоциановые соединения	+
Аскорбиновая кислота	+
Дубильные вещества	+
Аминокислоты	+
Алкалоиды	-

Проведенный первичный фитохимический анализ цветков каштана конского обыкновенного подтверждает наличие в цветках флавоноидов, спирторастворимых сапонинов, антоциановых соединений, полисахаридов в форме слизей, органических кислот, аскорбиновой кислоты и дубильных веществ, а также отсутствие алкалоидов.

5.3. Количественное определение фенольных соединений в цветках каштана конского

5.3.1. Определение флавоноидов в цветках каштана конского

5.3.1.1. Разработка и валидация методики определения флавоноидов в цветках каштана конского

Согласно литературным данным известно, что в цветках каштана конского содержатся флавоноиды, они могут рассматриваться в качестве целевой группы БАВ, обладая капилляропротекторной, антиоксидантной и противовоспалительной активностью [35]. Следовательно, при комплексном изучении фитохимического состава цветков актуальным следует считать исследование состава флавоноидов и разработку методик их идентификации и количественного определения для последующего включения в проект ФС на данное растительное сырье [39, 50, 84, 134].

Для определения суммы флавоноидов адаптировали известную фармакопейную методику их количественного анализа методом дифференциальной спектрофотометрии в цветках бузины черной (*Sambucus nigra* L.) ГФ РФ XIV ФС.2.5.0008.15. [26] (Глава 2, п. 2.9). «В части подбора оптимальных условий (Таблица 22) выделения из сырья (выявление оптимального соотношения сырья и экстрагента, времени экстрагирования, кратности экстракции, измельченности сырья) и последующих условий комплексообразования и спектрофотометрирования (временя, необходимое для созревания окраски продуктов взаимодействия флавоноидов с раствором хлорида алюминия и его соотношение с извлечением, а также стабильность полученного комплекса во времени)» [50].

Вид спектров поглощения извлечений из цветков относительно растворов сравнения демонстрировал наличие выраженного пологого максимума в диапазоне 407±2 нм, что свидетельствовало о возможности использования СО рутина для проведения пересчета суммы флавоноидов (Рисунок 34).

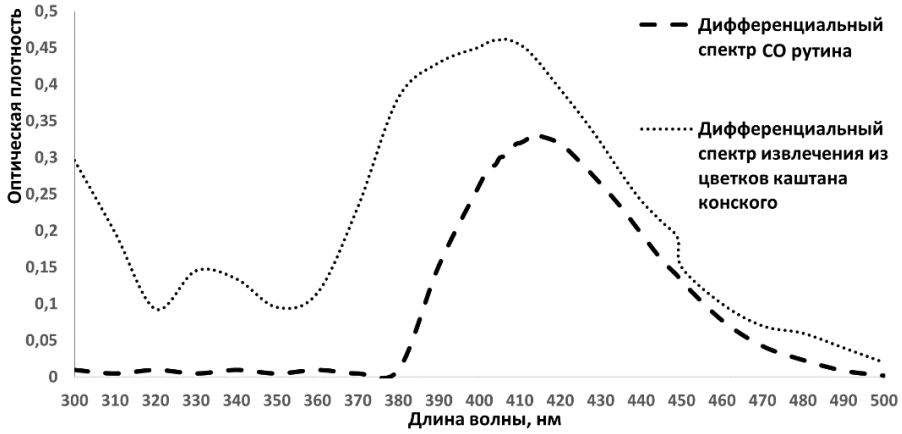


Рисунок 34 – Вид дифференциальных спектров поглощения комплекса флавоноидов цветков каштана конского с алюминием (на примере сырья, заготовленного на территории Воронежской области) и комплекса РСО рутина с алюминием

«При определении оптимального времени экстрагирования измерение оптической плотности осуществляли в течении 1,5 часов с момента закипания растворителя с интервалом 10 минут в течение 1,5 часов, с применением однократной и двукратной экстракции» [50]. Максимальный выход флавоноидов наблюдался через 60 минут экстрагирования, с использование двукратной экстракции (Таблица 22).

«Для определения оптимального времени созревания окраски комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом измерение оптической плотности осуществляли с момента добавления к извлечению из цветков каштана конского обыкновенного спиртового раствора хлорида алюминия 2%, с интервалом 10 минут в течение часа (Рисунок 35). Оптимальное время созревания окраски составило 50 минут. При этом стабильность комплекса наблюдается в течение последующих 10 минут. Затем оптическая плотность резко снижается в связи с возможным разрушением комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом» [50].

Также было определено оптимальное соотношение извлечения и алюминия хлорида 2%, составившее 1:2 (Таблица 22). Установлено, что традиционное добавление к извлечению 0,1 мл уксусной кислоты разведенной не способствует увеличению выхода флавоноидов (Таблица 22).

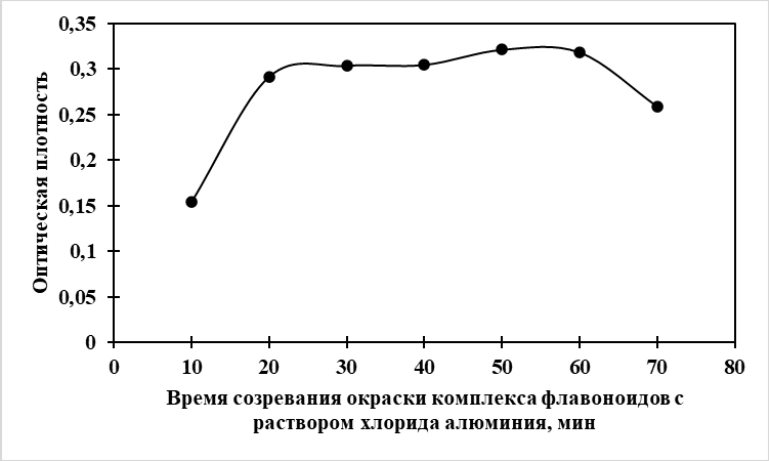


Рисунок 35 – Время созревания окраски комплекса флавоноидов с раствором хлорида алюминия [50]

Таблица 22 – Выбор оптимальных условий извлечения суммы флавоноидов из цветков каштана конского

<table>
<tr><td>Исследуемый параметр извлечения</td><td colspan="6">Содержание суммы флавоноидов, %</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Экстрагент</td><td rowspan="2">Вода</td><td colspan="5">Спирт этиловый</td></tr>
<tr><td>20%</td><td>40%</td><td>50%</td><td>70%</td><td>96%</td></tr>
<tr><td></td><td>2,10±0,03</td><td>2,27±0,04</td><td>3,89±0,10</td><td>3,77±0,02</td><td>4,36±0,11</td><td>3,63±0,04</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Сырье: экстрагент</td><td>Однократная 1:50</td><td colspan="2">Однократная 1:100</td><td colspan="2">Двукратная 1:50</td><td>Двукратная 1:100</td></tr>
<tr><td>3,51±0,1</td><td colspan="2">2,8±0,08</td><td colspan="2">3,65±0,11</td><td>4,51±0,14</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Время экстракции мин</td><td>30</td><td colspan="2">60</td><td colspan="2">90</td><td>120</td></tr>
<tr><td>3,71±0,07</td><td colspan="2">4,40±0,09</td><td colspan="2">4,00±0,08</td><td>3,48±0,07</td></tr>
<tr><td>Время созревания окраски, мин</td><td colspan="6">50</td></tr>
<tr><td>Стабильность комплекса флавоноидов во времени</td><td colspan="6">С 50 до 60 минуты после добавления комплексообразователя (10 мин)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Диаметр отверстий сита, мм</td><td>0,5</td><td colspan="2">1</td><td colspan="3">2</td></tr>
<tr><td>3,60±0,11</td><td colspan="2">5,23±0,02</td><td colspan="3">1,47±0,04</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Оптимальное соотношение извлечения и алюминия хлорида 2%</td><td colspan="3">1:1</td><td colspan="3">1:2</td></tr>
<tr><td colspan="3">4,53±0,1</td><td colspan="3">4,78±0,11</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Подкисление раствором уксусной кислоты</td><td colspan="3">С добавлением уксусной к-ты</td><td colspan="3">Без добавления уксусной к-ты</td></tr>
<tr><td colspan="3">3,37±0,11</td><td colspan="3">4,46±0,13</td></tr>
</table>

Учитывая, что изучение технологических параметров, позволяющих максимально полно извлекать БАВ из растительного сырья, приобретает все большую актуальность, проведено также изучение влияния ультразвука на извлечение флавоноидов из цветков каштана конского [50, 56]. Точную навеску измельченных цветков каштана со спиртом этиловым экстрагировали на ультразвуковой бане при температуре 45ºС и частотой 50 Гц, а также на водяной бане с обратным холодильником по вышеописанным параметрам. Результаты сравнительной оценки двух способов выделения флавоноидов из цветков приведены в Таблице 23.

Таблица 23 – Сравнительная характеристика способов экстракции флавоноидов из цветков каштана конского

Параметр получения извлечения	УЗ-баня	Водяная баня
Размер частиц, мм		
0,5 – 0,2	3,74±0,12	3,60±0,11
1,0 – 0,5	2,30±0,07	5,23±0,02
2,0 – 1,0	1,46±0,04	1,47±0,04
Концентрация спирта, %		
40	2,37±0,07	3,40±0,11
50	1,85±0,05	4,37±0,14
70	2,30±0,07	5,23±0,16
Время экстракции, мин		
30	1,12±0,03	1,86±0,06
60	2,30±0,07	5,23±0,16
120	1,27±0,04	1,79±0,05

Из данных Таблицы 23 следует, что при использовании водяной бани (суммарно по исследуемым параметрам получения извлечения) количество извлекаемых флавоноидов в два раза выше, чем при использовании УЗ - экстракции.

Методика количественного определения: аналитическую навеску (1,0000 г) измельченной до размера частиц фракции, проходящей сквозь сито с диаметром отверстий 1,0 мм, растительного сырья помещали в колбу коническую объемом 100 мл, заливали 50 мл спирта этилового 70% и взвешивали. Экстракцию осуществляли в течение 30 минут на водяной бане с обратным холодильником.

Для получения раствора А, извлечение охлаждали, при необходимости доводили до первоначальной массы экстрагентом и фильтровали через бумажный фильтр «Белая лента» в мерную колбу на 100 мл. Сырье и фильтр возвращали в коническую колбу и заливали 50 мл спирта этилового 70%, взвешивали и повторяли экстракцию в течении 30 мин, охлаждали, доводили до массы и фильтровали через бумажный фильтр «Белая лента» в ту же мерную колбу на 100 мл, при необходимости доводили объем спиртом этиловым 70% до метки (раствор А). Рабочий раствор готовили в мерной колбе объемом 25 мл, куда помещали 1,0 мл раствора А, и 2,0 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте этиловом, объем раствора доводили до метки 95% спиртом этиловым.

Раствор сравнения: 1,0 мл раствора А, доведенного 95% спиртом этиловым до метки в мерной колбе вместимостью 25,0 мл. Оптическую плотность измеряли через 50 минут после добавления алюминия хлорида в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно измеряли оптическую плотность СО рутина. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1,0 мл 0,05% раствора рутина, 2,0 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте этиловом и доводили объем раствора 95% спиртом до метки. Раствор сравнения: в мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1,0 мл 0,05% раствора СО рутина и доводили объем раствора 95% спиртом до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (Х) в процентах в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле (1):

$$X = \frac{A \times a_0 \times 100 \times 1 \times 25 \times 100 \times 100 \times P}{A_0 \times a \times 100 \times 1 \times 25 \times 100 \times (100 - W)} =$$

$$= \frac{A \times a_0 \times 100 \times P}{A_0 \times a \times (100 - W)}, \qquad (1)$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора после взаимодействия с $AlCl_3$; A_o – оптическая плотность СО рутина после взаимодействия с $AlCl_3$; а – масса сырья, г; a_o – масса СО рутина, г; Р – содержание рутина в фармакопейном СО рутина; W – потеря в массе при высушивании, %

В случаях отсутствия СО рутина, допускается альтернативный вариант вычисления содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин (X) в процентах в абсолютно сухом сырье с применением удельного показателя поглощения рутина с алюминия хлоридом в соответствии с рекомендациями действующих ФС на календулы и бузины черной цветки ГФ РФ XIV издания по формуле (2):

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{A_{1см}^{1\%} \times a \times 1 \times (100 - W)} = \\ = \frac{A \times 250000}{A_{1см}^{1\%} \times a \times (100 - W)}, \qquad (2)$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора после взаимодействия с $AlCl_3$; а – масса сырья, г; W – потеря в массе при высушивании, %; $A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутина с $AlCl_3$ при длине волны 408 нм, равный 248 [27];

С использованием разработанной методики было определено содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин при анализе цветков каштана конского различных регионов произрастания (Таблица 24, Рисунок 36).

Таблица 24 – Содержание суммы флавоноидов в цветках каштана конского различных регионов произрастания в пересчете на рутин (%) и абсолютно сухое сырье

Регион произрастания	Сумма флавоноидов, %
Петрозаводский городской округ	3,41 ± 0,11
Ленинградская область	4,46 ± 0,14
Московская область	3,30 ± 0,11
Воронежская область	3,30 ± 0,11
Волгоградская область	3,53 ± 0,11
Ставропольский край	4,55 ± 0,15

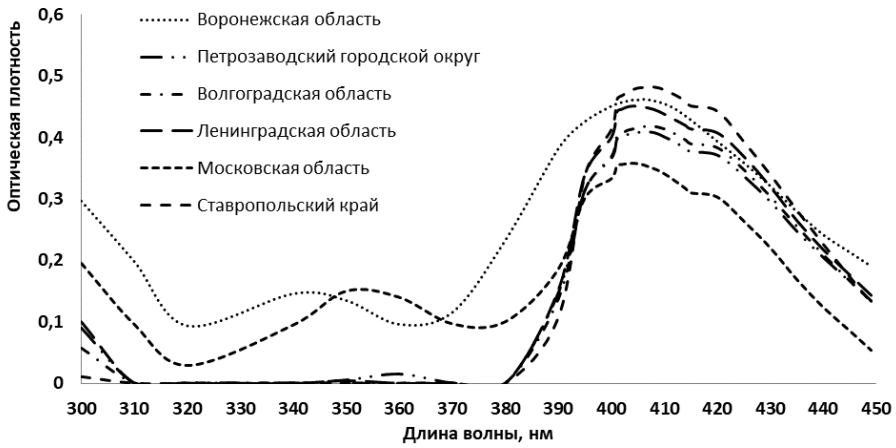


Рисунок 36 – Вид дифференциальных спектров поглощения комплекса флавоноидов цветков каштана конского различных регионов произрастания с алюминием

Содержание флавоноидов в зависимости от региона варьировало от 3,30 до 4,55%. Наибольшее содержание флавоноидов в пересчете на рутин показали цветки, заготовленные в Ставропольском крае (4,55%), что может быть связано с самым благоприятным сочетанием климатических условий региона (Глава 2, п. 2.1). [50].

В результате расчета метрологических характеристик разработанной методики (на примере цветков каштана конского, произрастающих на территории Воронежской области) установлено, что относительная ошибка с доверительной вероятностью 95% составляет около 3%, т.е. находится в пределах случайной ошибки (Таблица 25).

Таблица 25 – Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в цветках каштана конского (P = 95 %; n = 6)

$X_{ср}$	S^2	S	$S_{хср}$	ΔX	$\Delta X_{ср}$	ε, %	$\varepsilon_{ср}$, %
3,30	0,01038	0,10187	0,04159	0,26	0,11	7,94	3,24

Валидация, как завершающий этап разработки методики, была проведена на примере сырья, заготовленного в Воронежской области. Принятое опорное

значение $3{,}32\times10^{-4}$ г/мл извлечения. При установлении специфичности методики использовался метод добавок. К извлечению добавляли 0,5 мл 0,05% раствора СО рутина, что сопровождалось гиперхромным смещением максимума поглощения комплекса флавоноидов цветков каштана конского с алюминия хлоридом на дифференциальном спектре (Рисунок 37).

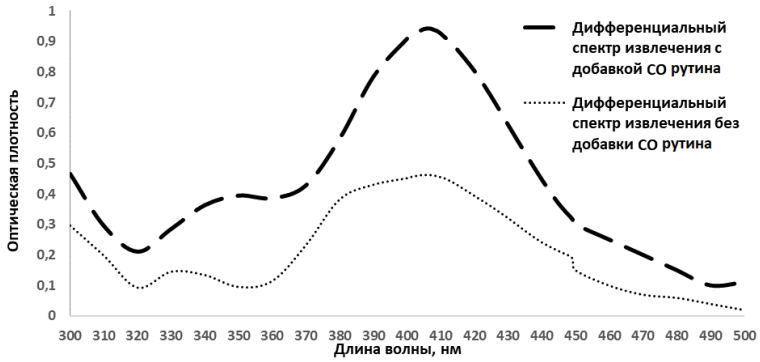


Рисунок 37 – Вид дифференциальных спектров поглощения комплексов алюминия с флавоноидами каштана конского при оценке специфичности методики

Для установления области линейности методики измеряли оптическую плотность 6 аликвот извлечения из цветков каштана конского обыкновенного в диапазоне от 70 до 130% от номинального значения, в результате чего была получена градуировочная зависимость (Рисунок 38).

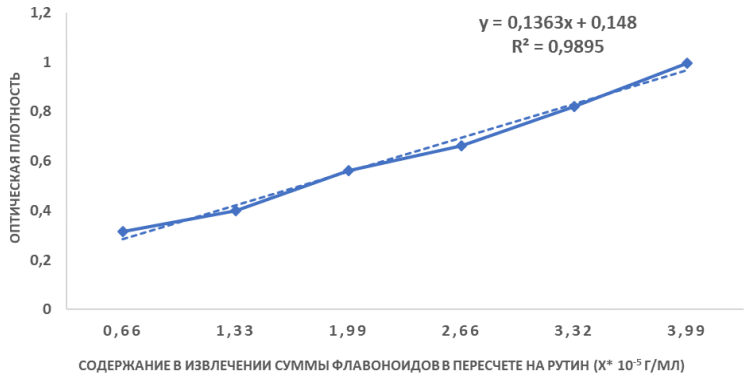


Рисунок 38 – Градуировочная зависимость величины оптической плотности от содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в анализируемом растворе

При определении показателя предел обнаружения установлено, что наименьшее количество определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено по разработанной методике, составило $0,2\times10^{-5}$ г/мл. Предел количественного определения составляет $0,52\times10^{-5}$ г/мл.

Оценку правильности разработанной методики проводили методом «введено-найдено» на четырех уровнях концентраций в 3 повторностях каждый (Таблица 26). Процент восстановления методики соответствовал требованиям к данному показателю (100±5%). Прецизионность методики на этапе сходимости выявляли на 6 параллельных определениях в одних условиях на одном и том же оборудовании одним и тем же оператором за один рабочий день (Таблица 27).

Робастность методики оценивалась по стабильности оптической плотности продуктов реакции $AlCl_3$ с комплексом флавоноидов извлечений из цветков каштана конского во времени (Глава 5 п. 5.3.1.1., Рисунок 35). Стабильность была подтверждена в период с 50 по 60 мин.

Таким образом, установлена валидность разработанной методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в цветках каштана конского (Таблица 28) [50].

Таблица 26 – Определение правильности методики количественного определения суммы флавоноидов в цветках каштана конского

Было (принятое опорное значение) г суммы флавоноидов в извлечении	Добавка СО рутина, г	Ожидаемое содержание, г	Полученное содержание, г	% восстановления
0,0003323578	0,00025	0,0005823578	0,000553019	95,00
			0,000585186	100,50
			0,000587940	100,96
	0,00035	0,0006823578	0,000702706	102,98
			0,000705882	103,45
			0,0006661420	97,62
	0,0005	0,0008323578	0,000797561	95,82
			0,000786100	95,00
			0,000840623	100,99
	0,000625	0,0009823578	0,000110695	112,68
			0,001012886	103,11
			0,001072103	109,14
Средний % восстановления методики				101,44

Таблица 27 – Определение сходимости методики количественного определения флавоноидов в цветках каштана конского

Номер опыта	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %
1	3,27
2	3,32
3	3,18
4	3,19
5	3,40
6	3,42
Среднее значение (SD, %)	3,30
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	3,09

Таблица 28 – Валидационные характеристики методики количественного определения в цветках каштана конского обыкновенного суммы флавоноидов в пересчете на рутин

Характеристика	Значение
Правильность	R = 101,44%
Сходимость	RSD = 3,09%
Линейность	y=0,1363x+0,148 R^2 = 0,9895
Минимальное значение, %	3,18
Максимальное значение, %	3,42
Среднее значение, %	3,30
Значение доверительного интервала (P=95%), %	3,30±0,10688
Область линейности	0,66-3,99×10^{-5} г/мл извлечения
Предел обнаружения	0,2×10^{-5} г/мл извлечения
Предел количественного определения	0,52×10^{-5} г/мл извлечения

На основании проведенных исследований можно рекомендовать унифицированный критерий оценки качества данного сырья для будущего проекта ФС «Цветки каштана конского обыкновенного» по показателю «Количественное определение» суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 2% [50].

5.3.1.2. Определение флавоноидов цветков каштана конского методом ТСХ

Для исследования состава в цветках каштана конского отдельных флавоноидов в общей сумме было проведено их разделение методом ТСХ [38, 39, 52, 84, 133]. Условия хроматографирования описаны в Главе 2 (п. 2.8).

При длине пробега подвижной фазы до 10 см на треке при визуальной обработке обнаруживалось присутствие 13 зон БАВ флавоноидной природы, среди которых идентифицированы рутин, кверцетин и апигенин в сравнении с достоверными СО (Рисунок 39).

При визуальной оценке треков с большим количеством разделяемых компонентов смеси с близкими значениями величин R_f возможны неточности, поэтому для расчета хроматографических параметров использовали компьютерную программу «Денситометр Сорбфил» (ООО «Имид», Краснодар).

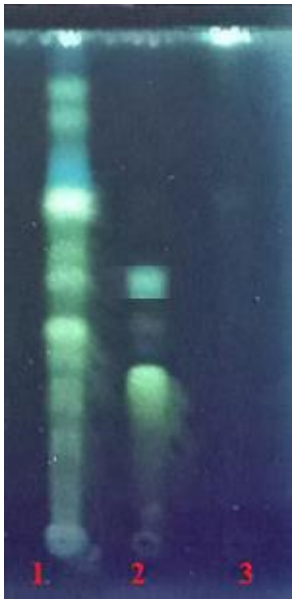


Рисунок 39 – Вид разделения зон флавоноидов методом ТСХ (1 – 10 мкл извлечения из цветков каштана конского обыкновенного, заготовленного на территории Воронежской области; 2 – 5 мкл смеси 0,1% стандартных растворов рутина и кверцетина; 3 – 5 мкл 0,1% стандартного раствора апигенина)

Расчет значений величин R_f при помощи данной программы считается более правильным, так как центр зоны не всегда совпадает с визуальным (Таблица 29). Эффективность разделения зон флавоноидов цветков каштана конского в использованной элюирующей системе может считаться удовлетворительной при длине пробега подвижной фазы не менее 13-14 см, так как разрешение двух соседних хроматографических зон (R) больше 1.5 (Таблица 29 и Рисунок 40).

Таблица 29 – Параметры селективности хроматографического разделения флавоноидов цветков каштана конского (высокоэффективная ТСХ «Silica gel 60 F254»; проявитель - 5% спиртовый раствор алюминия хлорида) по данным программы «Денситометр Сорбфил» (на примере извлечения из цветков, заготовленных на территории Воронежской области)

Пик	этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода (5:1:1)						Цвет зоны в УФ-свете
	10×10 см			10×15 см			
	R_f±0,02	α*	R**	R_f±0,02	α*	R**	
1	0,02	49	2,04	0,02	49	2,04	голубовато-зеленый
2	0,04	24	2,09	0,04	24	2,09	
3	0,08	11,5	3,25	0,08	11,5	1,72	зеленоватый
4	0,22	3,54	1,44	0,13	6,69	1,67	
5	0,29	2,45	1,10	0,20	4,0	1,50	голубовато-зеленый
6	0,31	2,23	1,37	0,27	2,7	1,52	
7	0,38	1,63	1,18	0,36	1,78	1,20	
8	0,42	1,38	1,44	0,40	1,5	1,90	зеленоватый
9	0,51	0,96	1,78	0,58	0,79	1,52	голубовато-зеленый
10	0,65	0,54	2,16	0,66	0,52	1,27	
11	0,8	0,25	1,56	0,71	0,41	1,50	
12	0,86	0,16		0,78	0,28	1,56	синий
13	0,95	0,05	3,20	0,85	0,18	6,0	ярко-голубой
14	-	-	-	0,97	0,03		Желто-зеленый

*α – селективность разделения; **R – разрешение двух хроматографических зон

Кроме того, увеличение длины пробега элюента до 14 см привело к появлению 14 зон флавоноидов, что может быть связано с тем, что в рамках одной зоны могло быть два вещества с близкими значениями величин R_f в данных условиях хроматографирования. Таким образом, данная методика может быть рекомендована к внедрению в действующую НД.

Известно, что накопление фенольных соединений (флавоноидов в частности) в растениях вариабельно и определяется не только генетическими особенности вида, но и зависит от различных факторов внешней среды. Так, интересным представлялось изучить профиль данных БАВ цветков, заготовленных от производящего растения в различных регионах произрастания (Глава 2, п.2.1) (Рисунок 41) с целью научного обоснования требования к виду хроматографического профиля разделения флавоноидов данного ЛРС.

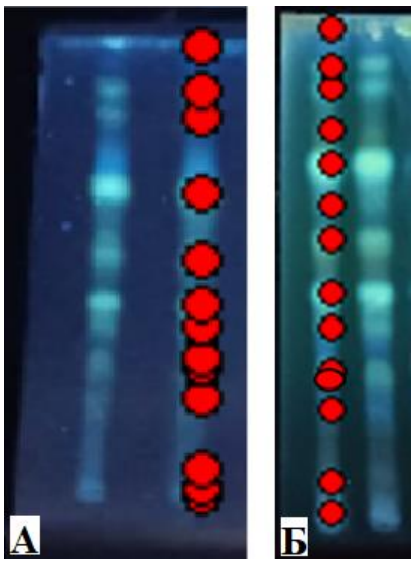


Рисунок 40 – Количество зон флавоноидов, распознанных программой «Денситометр Сорбфил» на треках (А – размер пластинки 10×10 см; Б – размер пластинки 10×15 см) (на примере извлечения из цветков, заготовленных на территории Воронежской области)



Рисунок 41 – Вид разделения зон флавоноидов извлечений из цветков каштана конского, заготовленных в различных регионах РФ методом ТСХ (1 - Воронежская область; 2 - Ленинградская область; 3 - Ставропольский край; 4 - Московская область; 5 - Петрозаводский городской округ; 6 - Волгоградская область)

Полученные данные показали, что при заготовке цветков от каштана конского, произрастающего в различных эколого-географических условиях, качественный состав флавоноидов не меняется (Таблица 30), однако значительно отличается по количественному содержанию отдельных компонентов в сумме, что можно проследить по размеру отдельных зон и интенсивности их флуоресценции.

Таблица 30 – Сравнительные данные по содержанию флавоноидов в извлечениях из цветков каштана конского по данным оценки площади хроматографической зоны

Пик	S хроматографической зоны (мкм^2)					
	Воронежская область	Ленинградская область	Ставропольский край	Московская область	Петрозаводский городской округ	Волгоградская область
1	91190	15024	17730	12036	11275	8356
2	9861	11658	34229	15209	27052	9364
3	10352	40955	12753	11070	17336	11668
4	57078	23690	37922	10120	8740	20002
5	70896	51036	44951	8912	53258	61284
6	78072	86145	67267	36448	75230	80823
7	204771	100150	70060	115968	84468	170765
8	143903	204415	136145	64217	124685	166752
9	49447	157119	44797	53835	183262	98280
10	266389	83713	90039	112352	107257	332620
11	80767	253026	103342	89022	211850	167617
12	133054	75535	11322	12326	36914	79751
13	129242	54700	106242	144590	148781	290234
14	67215	46818	24329	16883	7941	23419

Подобранная ТСХ-методика разделения флавоноидов и идентификации изучаемого сырья по виду хроматографического профиля показала воспроизводимость величин R_f зон флавоноидов на треках извлечений из цветков, заготовленных в различных регионах РФ (Рисунок 42).

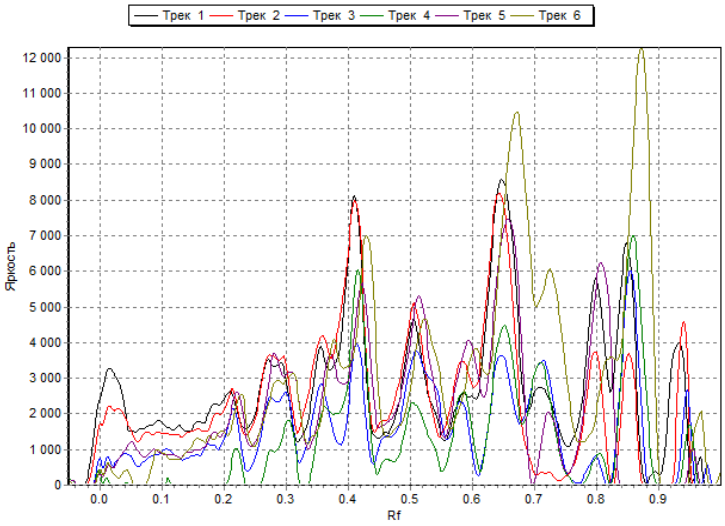


Рисунок 42 – Аналоговые кривые треков разделения флавоноидов извлечений из цветков каштана конского, заготовленных в различных регионах РФ (1 - Воронежская область; 2 - Ленинградская область; 3 - Ставропольский край; 4 - Московская область; 5 - Петрозаводский городской округ; 6 - Волгоградская область)

Для оценки влияния эколого-географических факторов на химический состав сырья был применен метод ИКС [84, 134]. Пробоподготовка и условия обработки спектров приведены в Главе 2 (п. 2.10). Воздействие климатических факторов произрастания на растение, может сказаться и на виде ИК-спектра, как совокупности полос поглощения, обусловленных присутствием комплекса БАВ в сырье, в т.ч. флавоноидов. Анализ спектров показал, что независимо от региона заготовки в ИК-спектрах наблюдаются сходные области полос поглощения по положению, что говорит о воспроизводимости вида спектра (Рисунок 43). Накопление фенольных соединений обусловливает наличие выраженных полос поглощения на спектрах в диапазоне от 3000 – 3300 $см^{-1}$ (валентные колебания ОН - группы в межмолекулярных водородных связях) и 1000 – 1300 $см^{-1}$ (деформационные колебания ОН - группы).

На спектре группы полос различаются, в основном, своей интенсивностью, что определяется, скорее всего, неодинаковым накоплением различных групп БАВ в сырье (Таблица 31).

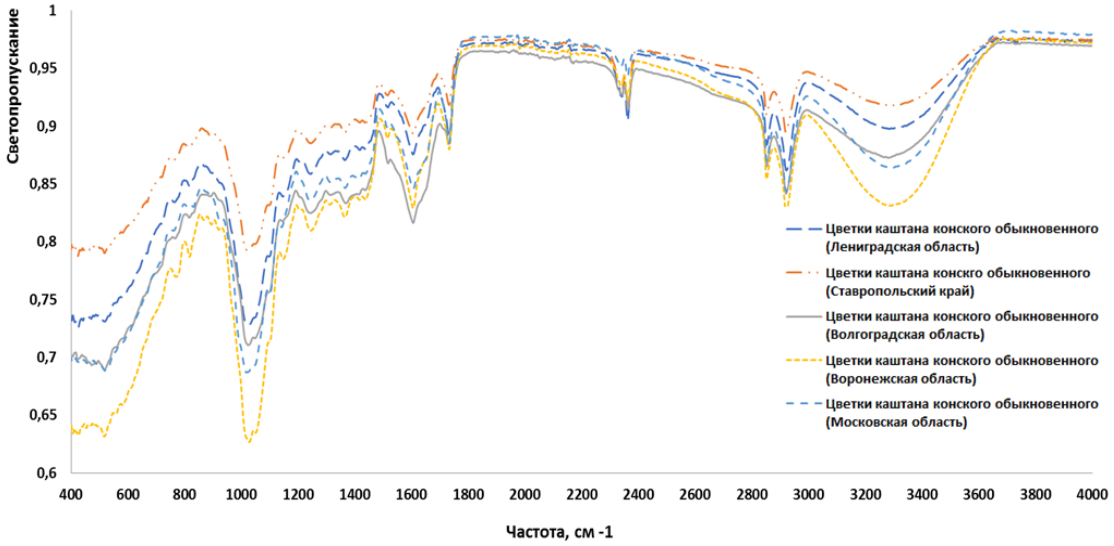


Рисунок 43 – Вид ИК-спектров изучаемых цветков, заготовленных в различных регионах произрастания на территории РФ в среднем диапазоне частот

Таблица 31 – Характеристические частоты поглощения в полученных ИК-спектрах изучаемого ЛРС

ЛРС/ Диапазон частот	ν, $см^{-1}$ (на спектрах)				
	Воронежская обл.	Ставропольский край	Ленинградская обл.	Волгоградская обл.	Московская обл.
1	2	3	4	5	6
3600-3200	3288	3282	3282	3280	3282
2960-2850	2920 2850	2918 2850	2920 2850	2920 2850	2920 2850
2000-1600	1731 1604	1731 1604	1733 1606	1730 1604	1731 1606
1556-1512	1516	1515	1514	1515	1514
1460-1450	1438 1415	1438 1415	1436 1417	1438 -	- 1411
1380-1300	1365 1315	1363 1315	1365 1317	1367 1313	1367 1309
1280-1010	1247 1149 1051 1028 916 894	1244 1153 - 1022 - 889	1244 - - 1028 - -	1238 1128 1099 1024 - -	1244 1141 1099 1014 927 -
840-800	868 817	- 821	- 815	- 815	- 819
750-720	769	761	761	765	759

Продолжение таблицы 31

1	2	3	4	5	6
580-400	516 - 426	516 - -	518 - 426	518 472 422	518 464 -

Однако, по виду ИК-спектра однозначно определить регион произрастания сырья не представляется возможным даже при интерпретации линий в области «отпечатков пальцев» (Рисунок 44).

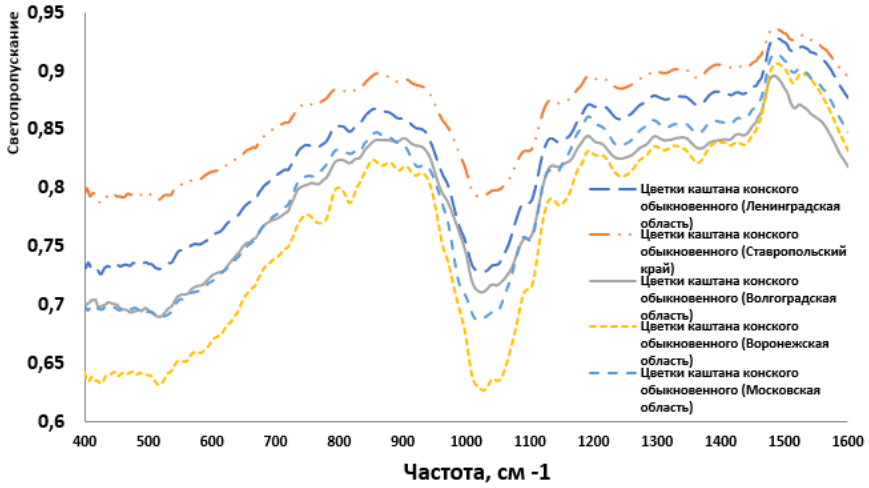


Рисунок 44 – Вид ИК-спектров изучаемых цветков, заготовленных в различных регионах произрастания на территории РФ в области «отпечатков пальцев»

Полученные данные, в целом, свидетельствуют о схожести химического состава сырья одного вида растения, произрастающего в различных эколого-географических условиях на территории РФ [39].

5.3.2. Определение лейкоантоцианов в цветках каштана конского

Несмотря на многочисленные исследования полифенольного состава цветков каштана конского, подтверждающие наличие широкого спектра фенольных соединений, лейкоантоцианы остаются наименее изученной группой БАВ в данном сырье. На данный момент существует небольшое количество статей, посвященных изучению антоцианов и проантоцианов в каштане конском [205, 212, 248, 257, 263, 265]. Как известно, лейкоантоцианы являются восстановленными формами флавоноидов. Содержание последних в цветках

каштана, как показали ранее проведенные исследования (п. 5.3.1.1 данной главы), значительно и составляет более 2%. Таким образом, изучение лейкоантоцианов в цветках каштана конского обыкновенного представляет значительный научный и практический интерес в связи с их потенциальной антиоксидантной активностью и возможностью применения в профилактике и терапии заболеваний, ассоциированных с окислительным стрессом. Оценки вариабельности накопления данной группы БАВ в цветках в зависимости от эколого-географических условий произрастания согласно литературным данным не обнаружено.

5.3.2.1. Разработка и валидация методики определения лейкоантоцианов в цветках каштана конского

Для определения суммы лейкоантоцианов в форме, собственно, антоцианидинов адаптировали известную фармакопейную методику их количественного анализа методом прямой спектрофотометрии в плодах черники обыкновенной ФС.2.5.0050.15 [27], использовав их свойство переходить в извлечения в виде антоцианидинов при нагревании с подкисленными спиртами.

Согласно литературным данным [84, 132, 134, 137, 139, 162], для извлечения антоцианов из растительного сырья в качестве экстрагента чаще всего используют этиловый спирт различных концентраций, содержащий хлористоводородной кислоты (от 1% до 5%). Результаты подбора оптимальной концентрации этилового спирта, подкисленного до концентрации 1%, представлены в Таблице 32. Исходя из полученных данных, оптимальным экстрагентом можно считать спирт этиловый 96%, подкисленный кислотой хлороводородной до концентрации 1%.

Таблица 32 – Выбор оптимальной концентрации экстрагента

Экстрагент	Содержание лейкоантоцианов, %
Спирт этиловый 96%	**0,39±0,02**
Спирт этиловый 80%	0,21±0,01
Спирт этиловый 70%	0,18±0,01
Спирт этиловый 60%	0,09±0,01
Спирт этиловый 50%	0,12±0,01
Спирт этиловый 40%	0,05±0,003

Следующим этапом работы был подбор измельченности цветков каштана конского (Таблица 33). Установлено, что размер частиц сырья, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, обеспечивает больший выход суммы лейкоантоцианов.

Таблица 33 – Подбор степени измельченности сырья

Диаметр отверстий сита, мм	Содержание лейкоантоцианов, %
7 мм	0,44±0,02
5 мм	0,28±0,01
3 мм	0,37±0,02
2 мм	0,38±0,02
1 мм	**0,51±0,03**
0,5 мм	0,51±0,03

Далее определяли влияние времени экстракции на выход изучаемой группы БАВ из цветков каштана конского (Таблица 34), которое составило 150 минут. Дальнейшее увеличение времени приводило к незначительному уменьшению содержания, практически оставаясь постоянным.

Таблица 34 – Определение оптимального времени экстракции

Время экстракции, мин	Содержание лейкоантоцианов, %
30	0,26±0,01
60	0,47±0,02
90	0,58±0,03
120	0,62±0,03
150	**0,68±0,03**
180	0,66±0,03
210	0,67±0,03

Наилучшим соотношением «сырье : экстрагент», как показали результаты эксперимента, было 1:75. Оно обеспечивало наибольший выход БАВ в извлечение (Рисунок 45).

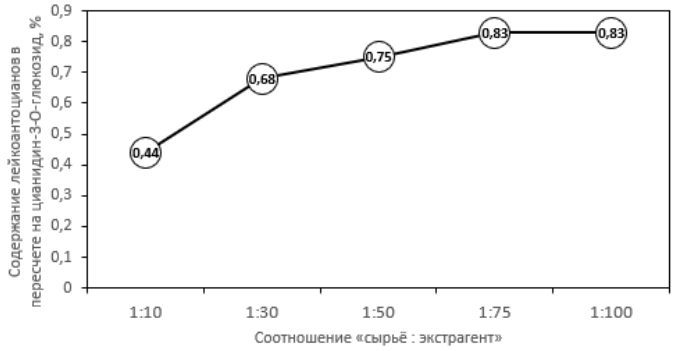


Рисунок 45 – Определение соотношения растительного сырья и экстрагента

На следующем этапе вели подбор концентрации хлористоводородной кислоты в экстрагенте. Минимально достаточный уровень кислотности необходим для стабилизации лейкоантоцианов, предотвращая их окислительную деградацию и способствуя переходу в более устойчивые оксониевые формы. Установлено, что минимально достаточная концентрация хлористоводородной кислоты в составе экстрагента составила 5% (Рисунок 46).



Рисунок 46 – Определение оптимальной концентрации хлористоводородной кислоты в экстрагенте

В результате проведенной серии экстракций установлено, что максимальный выход суммы лейкоантоцианов составил 1,74% при однократной экстракции, двухкратная и трехкратная, при сохранении всех выше подобранных параметров, показали 0,94% и 1,37% соответственно.

Методика реализуется следующим образом: около 1,0 г сырья (точная навеска) измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями

размером 1 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 75 мл спирта 96%, содержащего хлористоводородной кислоты 5%. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с точностью до ± 0,01 г, затем присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 150 мин, затем охлаждают до комнатной температуры, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (раствор А), отбрасывая первые порции фильтрата. 1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96%, содержащим хлористоводородную кислоту 5%, до метки и перемешивают (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 546 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96%, содержащий хлористоводородной кислоты 5% (Рисунок 47).

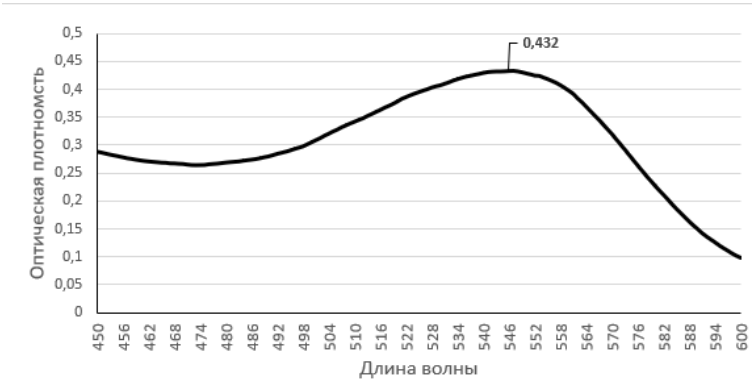


Рисунок 47 – Вид спектра поглощения извлечения из цветков каштана конского, полученного с применением подкисленного спирта этилового 96%

Содержание суммы лейкоантоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид в абсолютно сухом сырье в процентах (Х) вычисляют по формуле (3):

$$X = \frac{A \times 75 \times 25 \times 100}{A_{1см}^{1\%} \times a \times 1 \times (100 - W)}, \qquad (3)$$

где А – оптическая плотность раствора Б в максимуме поглощения; $A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида при длине волны 546 им, равный 600 [27]; а – навеска сырья, г; W – влажность, %.

Сведения об основных метрологических характеристиках методики систематизированы в Таблице 35. Валидационные расчёты выполнялись относительно опорного значения содержания, составившего 1,73 ± 0,015 % в сырье.

Таблица 35 – Метрологические характеристики спектрофотометрического определения лейкоантоцианов в цветках каштана конского (P=95%, n = 9)

$X_{ср}$	S^2	S	$S_{xср}$	ΔX	$\Delta X_{ср}$	ε, %	$\varepsilon_{ср}$, %
1,48	0,00029	0,01696	0,00565	0,03917	0,01306	2,65	0,88

Специфичность спектрофотометрической методики подтверждается тем, что аналитический максимум при 546 ± 2 нм соответствует максимуму поглощения антоцианов в подкисленном этиловом спирте (96%), в то время как спектр самого подкисленного растворителя не дает поглощения в этой области и регистрируется нулевое значение оптической плотности, совпадающее с «базовой линией». Таким образом, методику можно считать специфичной, поскольку аналитический сигнал в данной области, согласно литературным и экспериментальным данным обусловлен исключительно антоцианами (Рисунок 48).

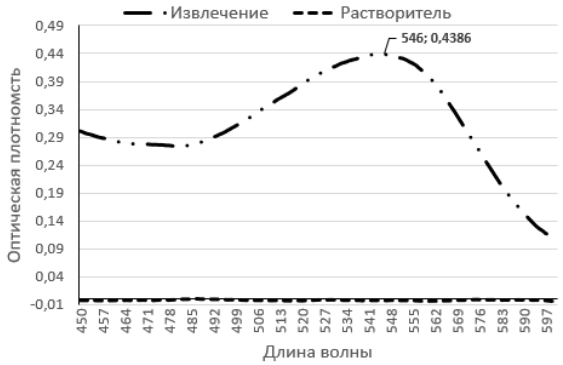


Рисунок 48 – Вид спектра поглощения извлечения из цветков каштана конского, относительно спектра растворителя - подкисленного спирта этилового 96%

Зависимость оптической плотности от содержания суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид линейна, что отражено на Рисунке 49 и

подтверждается значением коэффициента корреляции, близким к 1,0. Аналитическая область методики (от 80% до 120% от номинального значения) соответствует от $0{,}41\times10^{-5}$ до $2{,}48\times10^{-5}$ г/мл антоцианових соединений в извлечении.

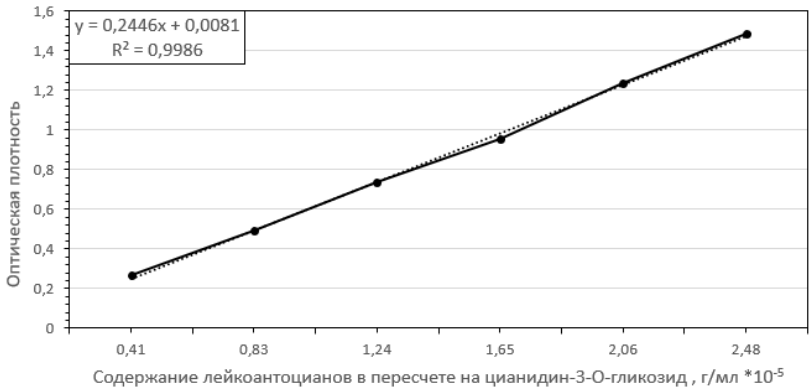


Рисунок 49 – График линейной зависимости оптической плотности от содержания антоцианов в извлечении в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид

При определении показателя предел обнаружения установлено, что наименьшее количество определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено по разработанной методике, составило $0{,}1\times10^{-5}$ г/мл. Предел количественного определения составляет $0{,}3\times10^{-5}$ г/мл.

«Повторяемость методики определялась в девяти повторениях одним исполнителем. Межлабораторную прецизионность подтверждали проведением измерения разными исполнителями в разные дни в девяти повторениях каждый» [164] (Таблица 36). Относительные стандартные отклонения не превысили критериев приемлемости в 5%».

Правильность методики считается подтверждённой, если свободный член уравнения линейной регрессии удовлетворяет условию: $b \leq \Delta b$; $\Delta b = t_{(0,05,\, n-2)} \times S_b$,

где b — свободный член уравнения, Δb — доверительный интервал свободного члена, $t_{(0,05;\ n-2)}$ — коэффициент Стьюдента, где 0,05 — уровень значимости и n-2 число степеней свободы, S_b — стандартное отклонение свободного члена.

В нашем случае, свободный член (b) = 0,0081, стандартное отклонение свободного члена (S_b) = 0,0127 исходя из этого доверительный интервал свободного члена (Δb) рассчитывается как 2,78×0,0127 и равняется 0,0353. Поскольку выполняется условие 0,0081 ≤ 0,0353, можно сделать вывод, что методика является правильной, так как свободный член статистически незначимо отличается от нуля.

Таблица 36 – Валидационные характеристики методики определения антоцианов в цветках каштана конского

Характеристика	Статистическая характеристика	Результат	
1	2	3	
Повторяемость	Проба	Содержание суммы лейкоантоцианов, %	
	1	1,46	
	2	1,46	
	3	1,46	
	4	1,47	
	5	1,47	
	6	1,48	
	7	1,49	
	8	1,5	
	9	1,5	
	-	Доверительный интервал (P=95%), % 1,48 ± 0,013	
	Стандартное отклонение (SD), %	1,7	
	Относительное стандартное отклонение (RSD), %	1,15	
Межлабораторная прецизионность	Проба	Исследователь 1 (день 1)	Исследователь 2 (день 2)
	1	1,49	1,46
	2	1,50	1,46
	3	1,50	1,46
	4	1,50	1,47
	5	1,50	1,48
	6	1,51	1,48
	7	1,52	1,49
	8	1,53	1,49
	9	1,54	1,5
	Доверительный интервал (P=95%), %	1,49 ± 0,008	
	Стандартное отклонение (SD), %	1,63	
	Относительное стандартное отклонение (RSD), %	1,09	

Продолжение таблицы 36

1	2	3
	Полученное значение критерия Фишера, вычисленное по результатам проведения испытаний разными исполнителями на разном оборудовании, должно быть меньше табличного значения $F_{практ} = S_1^2 / S_2^2 \leq F_{теор}$	$F_{практ} = S_1^2 / S_2^2 = 0{,}0002875 / 0{,}000275 = 1{,}05$ $F_{теор} = 3{,}44$ $F_{практ} \leq F_{теор}$

Таким образом, было доказано, что разработанная методика валидна и, может использоваться для определения содержания лейкоантоцианов в цветках каштана конского в пересчете на собственно антоциановые соединения для цели их стандартизации.

Результаты спектрофотометрического анализа содержания суммы лейкоантоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид в цветках конского каштана выявили вариабельность их содержания в зависимости от региона заготовки (Таблица 37, Рисунок 50). Наибольшее содержание лейкоантоцианов отмечено в цветках каштана, заготовленных в Петрозаводском городском округе (1,72 ± 0,015%), характеризующемся относительно низкими среднегодовыми температурами (+3,8°С), высоким уровнем осадков (756 мм/год) и минимальным количеством солнечных дней (63 дня/год) [7, 87, 131]. В то же время, в Волгоградской области с более благоприятными климатическими условиями (158 солнечных дней/год) [87] содержание лейкоантоцианов оказалось существенно ниже (1,27%). Полученные данные позволяют предположить, что повышенное накопление лейкоантоцианов в растениях северных регионов представляет собой адаптивную реакцию на комплекс стрессовых факторов среды. В условиях пониженных температур и недостаточной инсоляции активируются механизмы синтеза фенольных соединений, выполняющих защитную функцию.

Таблица 37 – Содержание суммы лейкоантоцианов в цветках каштана конского различных регионов произрастания, в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид (%)

Регион произрастания	Сумма лейкоантоцианов, %
1	2

Продолжение таблицы 37

1	2
Петрозаводский городской округ	1,72 ± 0,015
Ленинградская область	1,33 ± 0,012
Московская область	1,30 ± 0,011
Воронежская область	1,51 ± 0,013
Волгоградская область	1,27 ± 0,011
Ставропольский край	1,67 ± 0,015

Лейкоантоцианы, как предшественники антоцианов, вероятно, участвуют в системе антиоксидантной защиты, предохраняя растительные ткани от повреждений, вызванных окислительным стрессом. Это согласуется с известными литературными данными о роли вторичных метаболитов в адаптации растений к неблагоприятным условиям среды [223, 240, 260, 262].

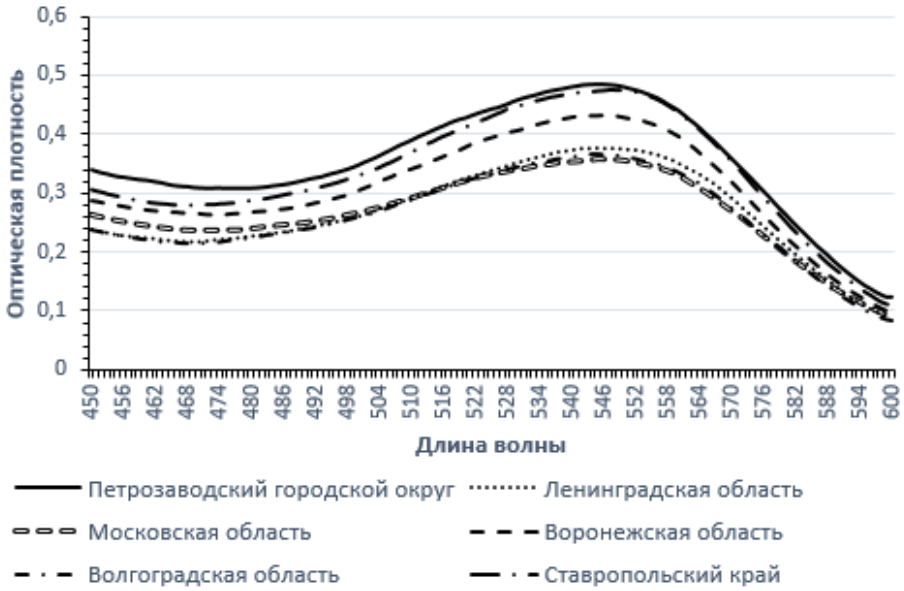


Рисунок 50 – Вид спектра поглощения продуктов окисления лейкоантоцианов в извлечении, полученном с применением подкисленного хлористоводородной кислотой спирта этилового 96%

Полученные результаты согласуются с литературными данными [205, 265], посвященными исследованию химического состава каштана конского.

5.3.2.2. Определение лейкоантоцианов цветков каштана конского методом ТСХ

На следующем этапе работы было проведено разделение лейкоантоцианов цветков каштана конского методом ТСХ [38]. «Апробация наиболее часто используемых систем для хроматографического разделения антоциановых соединений показала, что оптимальное их разделение достигается в системе бутанол - уксусная кислота ледяная - вода (4:1:5), оптимальный объем пробы раствора, приготовленного для количественного определения составил 10 мкл на пластинках ПТСХ-АФ-А марки «Sorbfil» (Россия) 10×10 см» [84, 133, 134, 159, 167] (Глава 5, п. 5.3.2.1), Таблица 38.

В данных условиях было детектировано 3 зоны (Рисунок 51), по окраске соответствующих группе антоциановых соединений с коэффициентами разделения (R) 2,24 и 2,23 соответственно.

Таблица 38 – Результаты разделения лейкоантоцианов методом ТСХ

№ п/п	Элюент	Зоны на хроматограммах (R_f ±0,03)			Окраска зоны адсорбции в видимом свете
1	бутанол - уксусная кислота ледяная-вода (4:1:5)	0,40	0,60	0,77	Розовая
2	муравьиная кислота безводная-вода-бутанол (16:19:65)	-	-	0,90	Зеленоватая
3	вода-уксусная кислота (40:60)	Нет разделения			
4	муравьиная кислота безводная-хлористоводородная кислота-вода (2:1:2)	Нет разделения			
5	Бутанол-раствор хлористоводородной кислоты (1:1)	0,36	-	-	Розовая

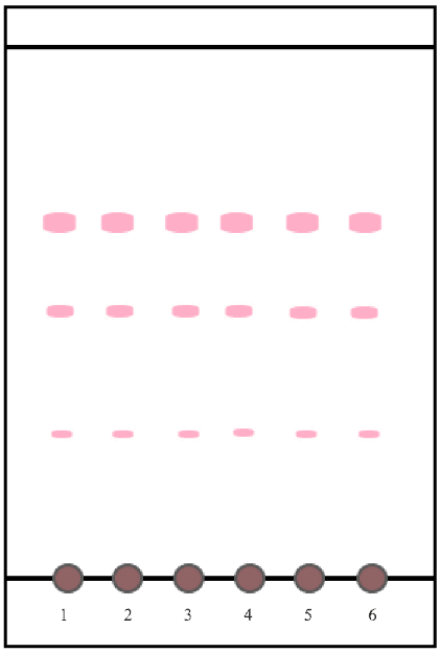


Рисунок 51 – ТСХ-схема разделения зон антоцианов подкисленных спиртовых извлечений из цветков каштана конского (1 - Петрозаводский городской округ; 2 - Ленинградская область; 3 - Московская область; 4 - Воронежская область; 5 - Волгоградская область; 6 - Ставропольский край)

Данные Рисунка 51 свидетельствуют также о том, что ТСХ-профиль антоциановых соединений в извлечениях из цветков каштана конского идентичен для всех изученных регионов произрастания растения.

5.3.3. Определение дубильных веществ в цветках каштана конского

Из литературных данных известно, что в цветках каштана конского содержатся дубильные вещества [146, 205, 261], фармакологические эффекты которых включают вяжущее, противовоспалительное и антимикробное и гемостатическое действие [84, 134].

Определение суммы дубильных веществ методом перманганатометрического титрования проводили согласно ОФС.1.5.3.0008.18 (Глава 2, п. 2.9). Результаты количественного определения дубильных веществ цветков каштана конского различных регионов произрастания представлены в Таблице 39 [53]. Результаты статистической обработки экспериментально полученных данных приведены в Таблице 40.

Таблица 39 – Результаты определения содержания дубильных веществ в цветках каштана конского различных регионов произрастания [53]

Регион произрастания	Содержание дубильных веществ, %
Петрозаводский городской округ	5,38±0,42
Ленинградская область	5,17±0,40
Московская область	6,51±0,51
Воронежская область	3,83±0,30
Волгоградская область	4,26±0,33
Ставропольский край	4,90±0,38

Таблица 40 – Метрологическая характеристика перманганатометрического определения суммы дубильных веществ (на примере цветков каштана конского, произрастающих на территории Воронежской области) (P = 95 %; n = 6)

$X_{ср}$	S^2	S	$S_{хср}$	ΔX	$\Delta X_{ср}$	ε, %	$\varepsilon_{ср}$, %
3,8284	0,0161472	0,28414	0,116	0,73308	0,29928	19,15	7,82

Выявлено, что наибольшее содержание данных БАВ в пересчете на танин было в сырье, заготовленном от производящего растения на территории Московской области (6,51%) и Петрозаводского городского округа (5,38%). Меньше всего дубильных веществ (примерно в 2 раза по сравнению с Московской областью), оказалось в сырье, выращенном в условиях Центрального Черноземья (Воронежской области) [53]. Обобщая полученные данные о варьировании содержания данных БАВ в цветках каштана конского в зависимости от региона произрастания, можно предложить следующий критерий качества сырья (в пересчете на абсолютно сухое сырье) по содержание суммы дубильных веществ – не менее 3%.

5.4. Исследование стериновой фракции биологически активных веществ цветков каштана конского

Фракция липофильных БАВ цветков каштана конского остается малоизученной в отношении состава и фармакологических свойств [152]. Однако, в связи с тем, что семена данного растения стандартизуются, согласно ФС.2.5.0117 «Каштана конского семена» ГФ РФ XV издания [26], по содержанию суммы ТС, актуальным являлось провести оценку перспективности

использования цветков растения в качестве источника не только флавоноидов, но и фитостеринов, в т.ч. сапонинов.

5.4.1. Определение стеринов в цветках каштана конского

В результате исследования спиртового экстракта цветков каштана конского (на примере ЛРС, заготовленного на территории Воронежской области) методом ГХ/МС (Глава 2, п 2.9) был идентифицирован в составе стериновой фракции γ-ситостерол, как представитель группы растительных стеринов [84, 134]. Масс-спектр γ-ситостерола представлен на Рисунке 52 [149].

Количественное определение содержания суммы фитостеринов в цветках каштана конского проводили в соответствии с известной спектрофотометрической методикой, основанной на взаимодействии стеринов с концентрированной серной кислотой при аналитической длине волны 328 нм в пересчете на эргостерин [9, 115]. Выбор фитостерина, на который следует вести пересчет в сумме, обосновывался наличием максимума при длине волны 328±3 нм на спектре спиртового извлечения из цветков каштана конского после нагревания его с конц. кислотой серной (Рисунок 53), характерного для эргостерина по данным литературы [9, 10].

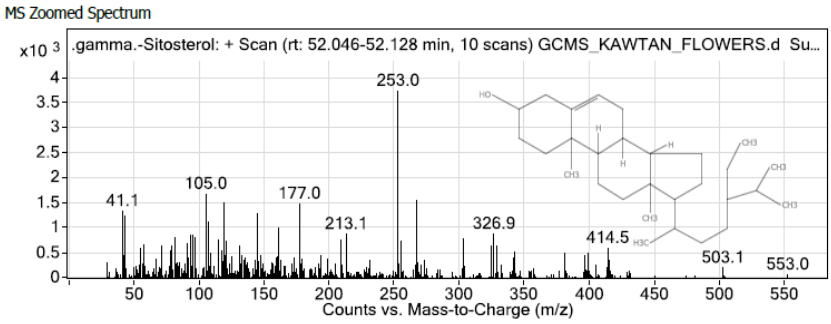


Рисунок 52 – Вид масс-спектра γ-ситостерола, выделенного из цветков каштана конского

Анализируя полученные результаты, следует отметить вариабельность содержания стеринов в сырье, в зависимости от регионов произрастания (Таблица 41). Расчет метрологических характеристик использованной методики (на примере сырья, заготовленного на территории Петрозаводского городского

округа) показал, что средняя относительная ошибка с доверительной вероятностью 95% составляет около 4%, т.е. находится в пределах случайной ошибки (Таблица 42) [149].

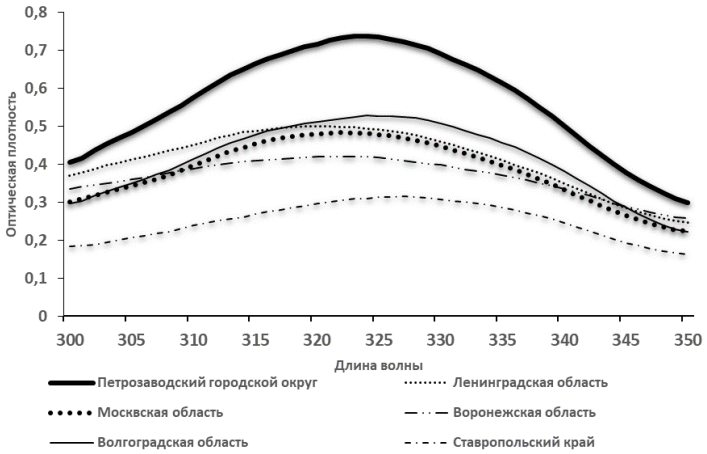


Рисунок 53 – Вид спектра поглощения продуктов взаимодействия спиртового извлечения из цветков каштана конского после нагревания с концентрированной кислотой серной [149]

Содержание фитостеринов в зависимости от региона варьировало от 7,06% до 12,97%. Наибольшее содержание стеринов в пересчете на эргостерин показали цветки, заготовленные в Петрозаводском городском округе (12,97%). Далее по мере перемещения от северных к южным районам заготовки наблюдалось снижение содержания данной группы БАВ в сырье. Исключением из данной тенденции стало сырье, заготовленное в Волгоградской области (зона степи с резко континентальным климатом и ветрами).

Таблица 41 – Содержание суммы стеринов в цветках каштана конского различных регионов произрастания, в пересчете на эргостерин и абсолютно сухое сырье, %

№ п/п	Регион произрастания	Сумма стеринов, %
1	Петрозаводский городской округ	12,97 ± 0,52
2	Ленинградская область	11,31 ± 0,45
3	Московская область	10,94 ± 0,44
4	Воронежская область	9,39 ± 0,37
5	Волгоградская область	11,99 ± 0,48
6	Ставропольский край	7,06 ± 0,28

Таблица 42 – Метрологическая характеристика результатов количественного определения суммы стеринов в пересчете на эргостерин в цветках каштана конского (P = 95 %; n = 6)

$X_{ср}$	S^2	S	$S_{хср}$	ΔX	$\Delta X_{ср}$	ε, %	$\varepsilon_{ср}$, %
12,364	0,09561	0,30921	0,15461	0,9833	0,4917	7,95	3,98

Полученные данные могут объясняться неблагоприятными климатическими условиями произрастания растения в регионах с холодным и континентальным климатом, исходя из данных о том, что стерины в растительных организмах являются факторами противодействия стрессовым условиям окружающей среды [149].

5.4.2. Определение сапонинов в цветках каштана конского

Сапонины представляют собой одну из наиболее перспективных с терапевтической точки зрения групп вторичных метаболитов, содержащихся в ЛРС. В официальной медицине используются семена каштана, их венотонизирующая и капилляропротекторная активность обусловлена содержанием комплекса ТС, основным действующим веществом среди которых является β-эсцин. В настоящее время практически отсутствуют работы, посвященные изучению сапонинов в цветках каштана, как в отечественной, так и в зарубежной научной литературе. Следовательно, в рамках всестороннего изучения фитохимического состава цветков актуальным следует считать исследование состава сапонинов и разработку методик их идентификации и количественного определения для последующего включения в проект ФС на данное растительное сырье.

5.4.2.1. Разработка и валидация методики определения тритерпеновых сапонинов в цветках каштана конского

Следует отметить, что попытки адаптации фармакопейной методики спектрофотометрического определения суммы ТС в пересчете на β-эсцин, изложенной в разделе «Количественное определение» ФС.2.5.0117 «Каштана конского семена» ГФ РФ XV издания [26], не показали успехов в виду отсутствия обозначенного максимума поглощения на спектрах экспериментальных

извлечений из изучаемого сырья. Поэтому для количественного определения суммы сапонинов в пересчете на β-эсцин была адаптирована [135] спектрофотометрическая методика, в основе которой лежит реакция окисления кислотой серной концентрированной, сопровождающаяся дегидратацией, что приводит к образованию окрашенных хиноидных структур.

На первом этапе была установлена оптимальная концентрация водно-спиртового экстрагента (Таблица 43), который, согласно литературным данным [93, 135, 147, 180], чаще всего используются для извлечения сапонинов из растительного сырья.

Таблица 43 – Выбор оптимальной концентрации экстрагента

Экстрагент	Содержание сапонинов суммы сапонинов в пересчете на β-эсцин, %
Спирт этиловый 96%	0,55±0,02
Спирт этиловый 70%	**1,23±0,02**
Спирт этиловый 40%	1,20±0,02

Оптимальным экстрагентом можно считать спирт этиловый в концентрациях 40-70%. В дальнейших исследованиях мы остановили свой выбор на спирте этиловом с объемной концентрацией 70% для возможного получения в перспективе исследования жидких спиртосодержащих ЛФ (настоек, экстрактов) из данного ЛРС с максимальным выходом в них целевых БАВ: не только сапонинов, но и флавоноидов [50].

На следующем этапе исследований подбирали степень измельченности цветков каштана конского. Полученные результаты приведены в Таблице 44.

Таблица 44. Подбор степени измельченности сырья

Диаметр отверстий сита, мм	Содержание сапонинов суммы сапонинов в пересчете на β-эсцин, %
5	0,91±0,01
3	0,72±0,01
2	**1,27±0,02**
1	0,72±0,01
0,5	0,54±0,01

Установлено, что размер частиц сырья, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, обеспечивали больший выход суммы сапонинов.

Далее определяли влияние времени экстракции на выход изучаемой группы БАВ из цветков каштана конского, результаты отражены в Таблице 45.

Таблица 45. Определение оптимального времени экстракции

Время экстракции, мин	Содержание сапонинов суммы сапонинов в пересчете на β-эсцин, %
30	0,91±0,01
60	1,22±0,02
90	**1,27±0,02**
120	1,19±0,02
150	0,58±0,01

Таким образом, оптимальное время экстракции для цветков каштана конского составило 90 минут. Дальнейшее увеличение времени приводило к постепенному уменьшению выхода изучаемых БАВ.

При определении оптимального соотношения «масса сырья: объем экстрагента» (Таблица 46) установлено, что соотношение 1:100 обеспечивало максимальный выход БАВ из растительного сырья.

Таблица 46. Определение оптимального соотношения «сырье : экстрагент»

Соотношение «масса сырья : объем экстрагента»	Содержание сапонинов суммы сапонинов в пересчете на β-эсцин, %
1:25	0,97±0,01
1:50	0,83±0,01
1:100	**1,22±0,02**
1:150	1,04±0,01
1:200	1,07±0,01

Проведенная серия экстракций позволила установить, что максимальный выход суммы сапонинов достигался при однократной экстракции и составлял 1,52%±0,02, двухкратная и трехкратная, при сохранении всех выше подобранных параметров, показали содержание в 1,0%±0,01 и 1,05%±0,01 соответственно.

Вид спектра поглощения продуктов взаимодействия сапонинов цветков каштана конского с кислотой серной концентрированной и раствора СО β-эсцина,

измеренного в аналогичных условиях, относительно кислоты серной концентрированной, демонстрировал наличие выраженного максимума при 322±3 нм, что свидетельствовало о возможности использования СО β-эсцина для проведения пересчета суммы ТС (Рисунок 54).

Методика определения суммы сапонинов в пересчете на β-эсцин для цветков каштана конского: около 0,5 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта этилового 70%.

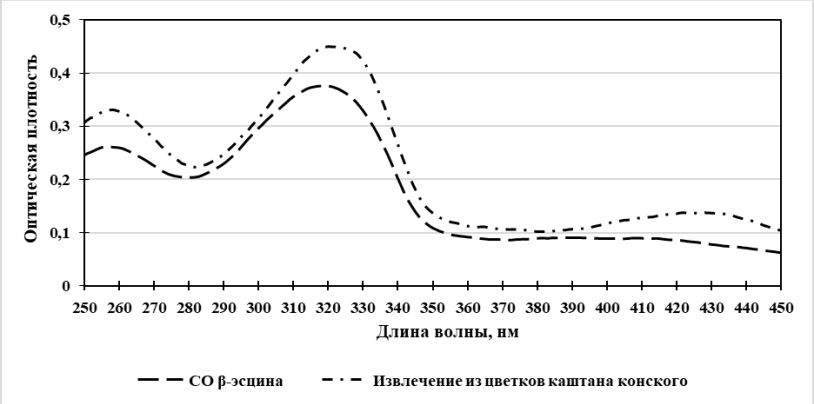


Рисунок 54 – Вид спектров поглощения продуктов взаимодействия сапонинов цветков каштана конского (на примере сырья, заготовленного в Воронежской области) и раствора СО β-эсцина с кислотой серной концентрированной

Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 90 минут. Колбу охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл, фильтр промывали 70% спиртом этиловым и доводили объем извлечения до метки тем же спиртом, перемешивали (раствор А). 1 мл раствора А помещали в выпарительную чашку и упаривали на кипящей водяной бане досуха. Затем сухой остаток дважды обрабатывали хлороформом по 5 мл. Объединенный хлороформный раствор упаривали на водяной бане, при температуре не выше 80˚С, остаток высушивали и к полученному сухому остатку добавляли 5 мл

кислоты серной концентрированной, перемешивали и термостатировали при температуре 70˚С 30 минут, полученный раствор охлаждали (раствор Б). К 1 мл раствора Б мерной пипеткой добавляли 9 мл кислоты серной концентрированной до общего объема в 10 мл и перемешивали. Оптическую плотность полученного окрашенного раствора измеряли на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 322±3 нм. Раствором сравнения выступала кислота серная концентрированная. Параллельно измеряли оптическую плотность 1 мл раствора Б СО β-эсцина, приготовленного в аналогичных условиях.

Приготовление раствора СО β-эсцина: около 0,05 г (точная навеска) СО β-эсцина помещали в мерную колбу на 100 мл, добавляли 50 мл спирта этилового 95%, перемешивали и доводили объем раствора спиртом до метки (раствор А). 1,0 мл раствора А доводили до общего объема в 10 мл кислотой серной концентрированной, перемешивали и термостатировали при температуре 70˚С 30 минут, полученный раствор охлаждали (раствор Б). Далее к 1,0 мл раствора Б количественно мерной пипеткой добавляли концентрированную серную кислоту, доводя общий объём до 10 мл, и перемешивали (раствор В). Затем 1 мл раствора В разводили кислотой серной концентрированной 1:10 (раствор Г). Раствор использовали свежеприготовленным. Содержание суммы ТС в пересчете на β-эсцин в % с учетом влажности сырья рассчитывали по формуле (4):

$$X,\% = \frac{A \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 5 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100 \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 1 \cdot 1 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W) \cdot 1 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 100} =$$

$$= \frac{A \cdot 250 \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W) \cdot 100}, \qquad (4)$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность СО; а – масса навески сырья; a_0 – масса СО; Р – содержание β-эсцина в фармакопейном СО β-эсцина; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Относительная ошибка с доверительной вероятностью 95% (на примере цветков каштана конского, произрастающих на территории Воронежской области) составляет менее 2%, т.е. находится в пределах случайной ошибки (Таблица 47).

Таблица 47 – Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин в цветках каштана конского (P = 95 %; n = 6)

f	$X_{ср}$	S^2	S	$S_{хср}$	ΔX	$\Delta X_{ср}$	ε, %	$\varepsilon_{ср}$, %
5	1,12	0,000203	0,014260	0,005822	0,04	0,01	3,27	1,34

Валидация, как завершающий этап разработки методики, была проведена на примере сырья, заготовленного в Воронежской области. В качестве опорного значения при валидации принято содержание $0{,}60\times10^{-5}$ г/мл в извлечении. Для оценки специфичности методики, к упаренному и очищенному хлороформом извлечению добавляли 0,1 мл 0,1% раствора СО β-эсцина, концентрированную серную кислоту и термостатировали, согласно условиям методики. Добавление раствора СО β-эсцина сопровождалось гиперхромным смещением на спектре максимума поглощения хиноидных структур сапонинов цветков каштана конского, образующихся в результате их окисления и дегидратации под действием кислоты серной концентрированной (Рисунок 55). При этом после добавки СО к извлечению на спектре дополнительных максимумов поглощения не появлялось, что свидетельствует о том, что выбранный аналитический экстремум определяется присутствием β-эсцина. Также специфичность подтверждена совпадением положения максимумов поглощения продуктов взаимодействия сапонинов извлечения и СО β-эсцина с концентрированной серной кислотой (Рисунок 55).

Для установления области линейности (Рисунок 56) методики измеряли оптическую плотность 5 аликвот извлечения из цветков каштана конского обыкновенного в диапазоне от 80% до 120% от номинального значения.

Аналитическая область методики (от 80% до 120% от номинального значения) соответствовала от $0{,}24\times10^{-5}$ до $0{,}72\times10^{-5}$ г/мл сапонинов в извлечении.

Наименьшее количество определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено по разработанной методике, составило $0{,}06\times10^{-5}$ г/мл. Предел количественного определения составляет $0{,}19\times10^{-5}$ г/мл.

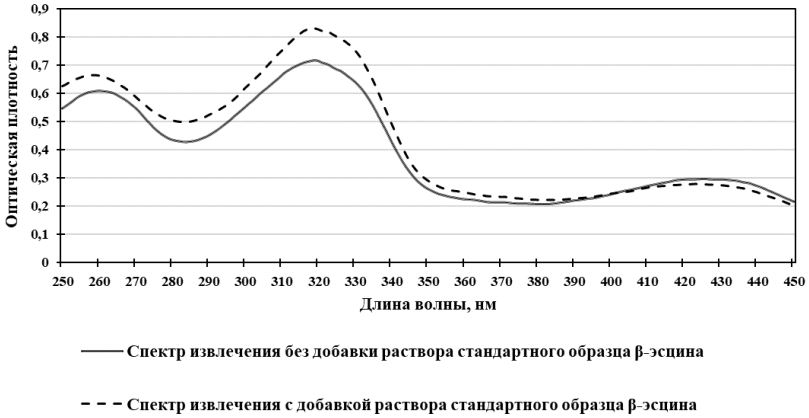


Рисунок 55 – Вид спектров поглощения продуктов реакции при нагревании сапонинов цветков каштана конского и раствора СО β-эсцина с кислотой серной концентрированной при оценке специфичности методики

Прецизионность методики на этапе повторяемости (сходимости) выявляли на 6 параллельных определениях в одних условиях на одном и том же оборудовании одним и тем оператором за один рабочий день. Относительные стандартные отклонения не превысили критерия приемлемости в 2%. Результаты приведены в Таблице 48.

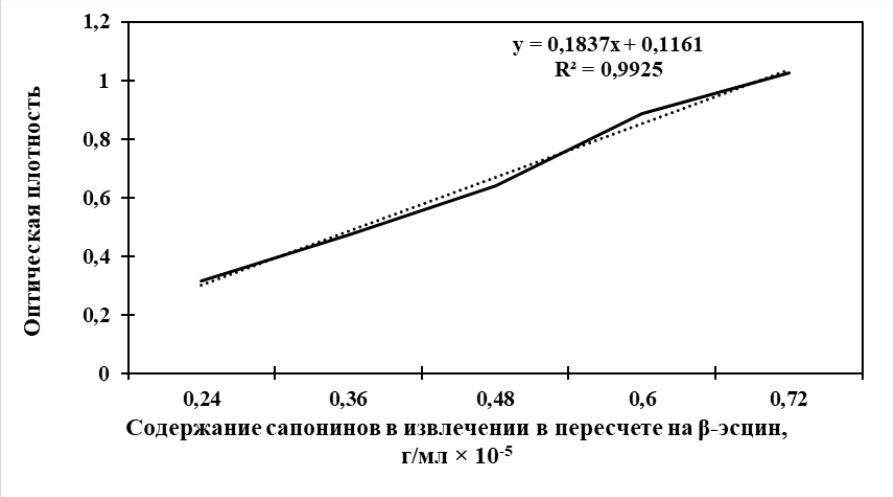


Рисунок 56 – Градуировочная зависимость величины оптической плотности от содержания суммы тритерпеновых сапонинов в извлечении в пересчете на β-эсцин

Способность аналитической методики быть устойчивой к влиянию небольших задаваемых изменений в условиях проведения испытания (робастность), определяли по устойчивости оптической плотности полученных окрашенных продуктов окислительной дегидратации сапонинов во времени (Рисунок 57). Созревание окраски наблюдалось к 30 минуте и сохранялось устойчивым при наблюдении до 60 минут.

Таблица 48 – Определение повторяемости методики количественного определения сапонинов в цветках каштана конского

Номер опыта	Содержание суммы сапонинов в пересчете на β-эсцин, %
1	1,11
2	1,11
3	1,12
4	1,12
5	1,13
6	1,14
Доверительный интервал (P=95%), %	1,12±0,014
Среднее значение (SD, %)	1,43
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	1,28

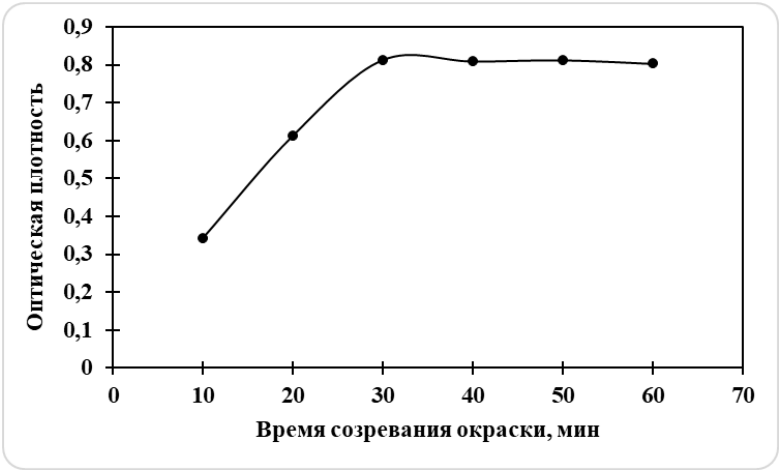


Рисунок 57 – Оценка робастности методики

Правильность методики считается подтверждённой, если свободный член уравнения линейной регрессии удовлетворяет условию: $b \leq \Delta b$; $\Delta b = t_{(0,05,\ n-2)} \times S_b$ (Глава 5, п. 5.3.2.1). В нашем случае, свободный член (b) = 0,1161, стандартное

отклонение свободного члена (Sb) = 0,0392, исходя из этого доверительный интервал свободного члена (Δb) рассчитывается как 3,18×0,0392 и равняется 0,1246. Поскольку выполняется условие 0,1161 ≤ 0,1246, можно сделать вывод, что методика является правильной, так как свободный член статистически незначимо отличается от нуля.

Таким образом, в результате исследования установлена валидность разработанной методики количественного определения суммы ТС в пересчете на β-эсцин в цветках каштана конского (Таблица 49).

С использованием разработанной и валидированной методики было определено содержание суммы сапонинов в пересчете на β-эсцин при анализе цветков каштана конского различных регионов произрастания (Таблица 50, Рисунок 58).

Оценка содержания ТС в цветках каштана конского показала региональные различия в диапазоне от 1,27 до 2,95%. Максимальное содержание сапонинов в пересчёте на β-эсцин выявлено в образцах из Петрозаводского городского округа (2,95%) и Волгоградской области (2,76%).

Таблица 49 – Валидационные характеристики методики количественного определения суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин в цветках каштана конского [149]

Характеристика	Значение
Правильность	$b \leq \Delta b$ 0,1161 ≤ 0,1246
Повторяемость (сходимость)	RSD = 1,27
Линейность	y=0,1837x+0,1161 R^2 = 0,9925
Минимальное значение, %	1,11
Максимальное значение, %	1,14
Среднее значение, %	1,12
Значение доверительного интервала (P=95%), %	1,12±0,014
Аналитическая область методики	0,24-0,72×10^{-5} г/мл извлечения
Предел обнаружения	0,06×10^{-5} г/мл извлечения
Предел количественного определения	0,19×10^{-5} г/мл извлечения

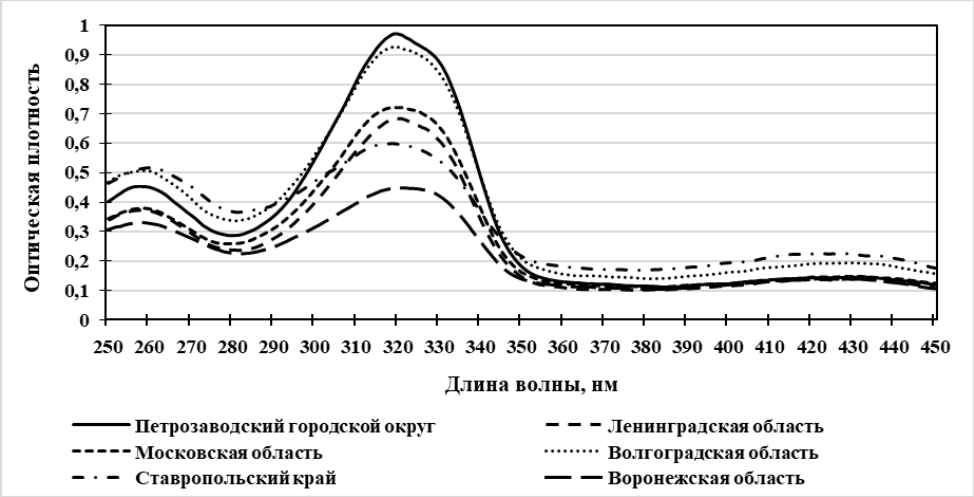


Рисунок 58 – Вид спектра поглощения продуктов взаимодействия сапонинов цветков каштана конского обыкновенного различных регионов произрастания с кислотой серной концентрированной

Полученные результаты согласуются с ранее описанными результатами количественного содержания суммы стеринов в пересчете на эргостерин в цветках каштана конского. ТС, как известно, имеют схожие со стериновой фракцией пути биосинтеза в ЛРС. Наибольшее накопление стеринов также наблюдалось в сырье из Петрозаводского городского округа (12,97%) и Волгоградской области (11,99%) [149] (Глава 5, п. 5.4.1).

Таблица 50 – Содержание суммы тритерпеновых сапонинов в цветках каштана конского различных регионов произрастания, в пересчете β-эсцин (%)

Регион произрастания	Содержание суммы сапонинов в пересчете на β-эсцин, %
Петрозаводский городской округ	2,95 ± 0,04
Ленинградская область	2,08 ± 0,03
Московская область	2,20 ± 0,03
Воронежская область	1,27 ± 0,02
Волгоградская область	2,76 ± 0,04
Ставропольский край	1,80 ± 0,02

Подобная закономерность может объясняться тем, что сапонины являются ключевыми факторами адаптации растений к неблагоприятным условиям

окружающей среды на фоне низких температур (Петрозаводский городской округ) и резко-континентального климата (Волгоградская область). Стерины стабилизируют клеточные мембраны при холоде, а сапонины усиливают антиоксидантную защиту и поддерживают гомеостаз клетки. При экстремальных условиях растение активирует единый адаптивный механизм, приводящий к одновременному увеличению их содержания.

5.4.2.2. Разделение тритерпеновых сапонинов цветков каштана конского методом ТСХ

Для исследования компонентного состава сапонинов, присутствующих в цветках каштана конского, проведено их разделение методом ТСХ [40, 111]. С целью научного обоснования требований к хроматографическому профилю сапонинов цветков каштана конского особый интерес представляло изучение сырья, заготовленного в различных эколого-географических зонах, так как значительная вариабельность накопления сапонинов в растениях определяется не только генетическими характеристиками вида, но и совокупным воздействием абиотических и биотических факторов среды (Рисунок 59). Условия хроматографирования описаны в Главе 2. (п. 2.8).

В результате исследования установлено, что качественный состав сапонинов цветков каштана конского характеризуется своей однородностью независимо от места произрастания производящего растения на Европейской части РФ. Однако наблюдается существенная изменчивость по количественному содержанию отдельных компонентов в сумме, что можно проследить по размеру отдельных зон и интенсивности их окраски, после обработки пластины проявителем (Таблица 51).

При длине пробега подвижной фазы 10 см на треках спиртовых извлечений из цветков каштана конского различных регионов произрастания, после обработки проявителем визуально обнаруживалось присутствие 8 зон БАВ. Установлено, что на всех треках, независимо от региона, присутствует зона, идентичная СО β-эсцина по величине R_f и цвету пятна и 3 характерно окрашенных зоны веществ, также относящихся к группе сапонинов.

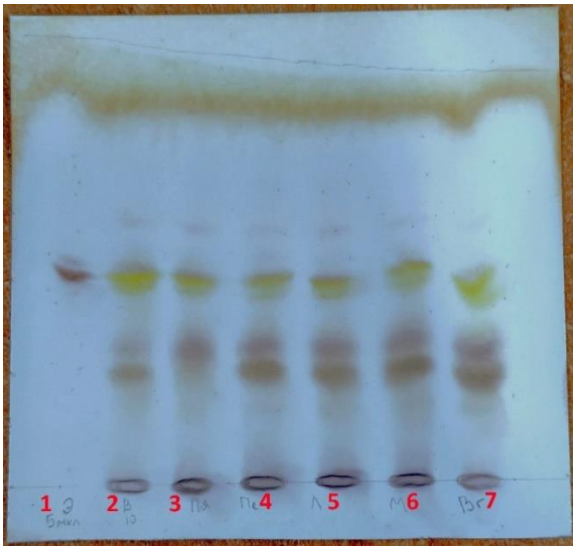


Рисунок 59 – Вид разделения зон сапонинов извлечений из цветков каштана конского (10 мкл), заготовленных в различных регионах РФ методом ТСХ (1 – 5 мкл 0,1% раствора СО β-эсцина; 2 – Воронежская область; 3 – Ставропольский край; 4 – Петрозаводский городской округ; 5 – Ленинградская область; 6 – Московская область; 7 – Волгоградская область)

Эффективность разделения зон сапонинов цветков каштана конского в использованной элюирующей системе может считаться удовлетворительной, поскольку разрешение двух соседних хроматографических зон больше 1,5.

Таблица 51 – Результаты оценки эффективности хроматографического разделения сапонинов цветков каштана конского (на примере извлечения из сырья, заготовленного на территории Воронежской области)

Пик	Параметры разделения			Окраска зоны адсорбции в видимом свете	Идентификация зон
	R_f±0,02	α*	R**		
1	2	3	4	5	6
1	0,19	4,26	1,49	Бледно-желтая	-
2	0,26	2,85	1,34	Коричневая	-
3	0,32	2,13	1,68	Фиолетовая	неидентифицированный сапонин
4	0,44	1,27	1,18	Бледно-желтая	-

Продолжение таблицы 51

1	2	3	4	5	6
5	0,48	1,08	1,04	Сине-фиолетовая с желтым гало	β-эсцин R_f СО β-эсцина – 0,47 ±0,02
6	0,49	1,04	1,13	Бледно-желтая	-
7	0,52	0,92	1,33	Бледно-фиолетовая	неидентифицированный сапонин
8	0,59	0,69	-	Бледно-розовая	неидентифицированный сапонин

*α – селективность разделения; **R – разрешение двух хроматографических зон.

Подобранная ТСХ-методика разделения сапонинов и идентификации изучаемого сырья по виду хроматографического профиля показала воспроизводимость величин R_f зон эсцина (SD – 0,75%; RSD – 1,56%) на треках извлечений из цветков, заготовленных в различных регионах РФ. В связи с чем, предложенная ТСХ-методика может быть рекомендована для включения в разработанный по результатам работы проект фармакопейной статьи на изучаемый вид ЛРС.

5.5. Определение некоторых других групп биологически активных веществ в цветках каштана конского

Компоненты первичного синтеза растений, например, углеводы (полисахариды и простые сахара), аминокислоты и органические кислоты, присутствуют во всех растительных объектах [75]. Данные соединения, попадая в организм человека, проявляют выраженные фармакологические эффекты, способствуют укреплению иммунитета, повышая устойчивость организма к стрессовым факторам окружающей среды, оказывают ранозаживляющее, обволакивающее, отхаркивающее, противомикробное и цитостатическое действие, а также обладают способностью улучшать усвоение других лекарственных средств [37, 75, 84, 134].

5.5.1. Определение углеводного комплекса биологически активных веществ цветков каштана конского

В доступной литературе встречаются немногочисленные данные, посвященные изучению углеводного комплекса цветков каштана конского, а также перспективности его дальнейшего использования в составе ЛРС и ЛРП. Принимая во внимание малую изученность класса полисахаридов, выделенных из каштана конского, а также потенциальную широту биологической активности и низкую токсичность данных соединений, исследование состава углеводов являлось актуальным [37, 52, 69, 71, 112, 174].

5.5.1.1. Количественное определение полисахаридов в цветках каштана конского различными методами

Количественное определение содержания суммы полисахаридов в ЛРС определяли гравиметрически после осаждения спиртом этиловым 95% (Глава 2, п. 2.9). Содержание суммы свободных и связанных простых сахаров в пересчете на глюкозу в сырье определяли с применением фармакопейной спектрофотометрической методике (пикриновый метод) (Глава 2, п. 2.9).

Метод гравиметрического определения является неспецифичным, но наиболее часто применяемым для первичного анализа содержания суммы полисахаридов в растительном сырье. Было установлено, что содержание суммы осаждаемых полисахаридов в зависимости от региона заготовки сырья варьировало от 5,61% до 12,95% (Таблица 52). Наибольшее значение данного показателя было определено в цветках каштана, заготовленных от растений, произрастающих в Волгоградской, Воронежской и Московской областях (около 12%). Минимальное количество данных БАВ содержалось в сырье, культивируемом в условиях Ставропольского края (5,61%). При сравнении полученных результатов с доступными литературными данными [146], получены сопоставимые значения в пределах одного региона заготовки сырья в разные годы. Так по данным авторов [146, 164], в цветках, заготовленных в Ставропольском крае (г. Минеральные воды, 2015 г), содержание осаждаемых полисахаридов составляло 3,2%.

Поэтому на следующем этапе работы для более селективной оценки содержания полисахаридов в изучаемом сырье провели их определение при помощи спектрофотометрической методики. В соответствии с ГФ РФ XIV изд. [27], для стандартизации ЛРС, содержащих полисахариды, применяется также спектрофотометрическая методика, основанная на реакции простых восстанавливающих сахаров с пикриновой кислотой в щелочной среде, после предварительного гидролиза хлористоводородной кислотой. Пикриновый метод позволяет оценить всю сумму простых сахаров (свободных и связанных в составе полисахаридов) в пересчете на глюкозу (или фруктозу) в полисахаридном комплексе ЛРС. Полученные спектры поглощения продуктов взаимодействия сахаров извлечений, полученных с применением кислотного гидролиза из цветков каштана конского различных регионов произрастания, с пикриновой кислотой приведены на Рисунок 60 [37].

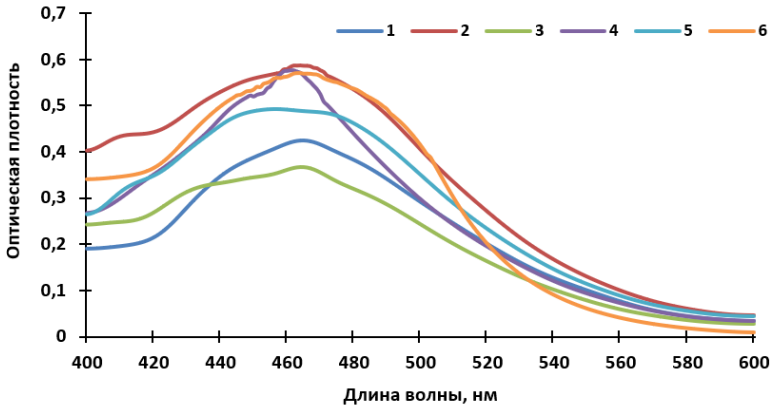


Рисунок 60 – Спектры поглощения продуктов взаимодействия сахаров извлечений, полученных с применением кислотного гидролиза из цветков каштана конского, с пикриновой кислотой (1 -Ленинградская область; 2 - Московская область; 3 - Воронежская область; 4 - Волгоградская область; 5 - Ставропольский край; 6 – Петрозаводский городской округ) [37]

Максимум поглощения при длине волны 465±2 совпадал с таковым на спектре, полученном для СО глюкозы (Рисунок 61) пикриновым методом, что

подтвердило возможность пересчета на этот моносахарид [37]. Результаты приведены в Таблице 52.

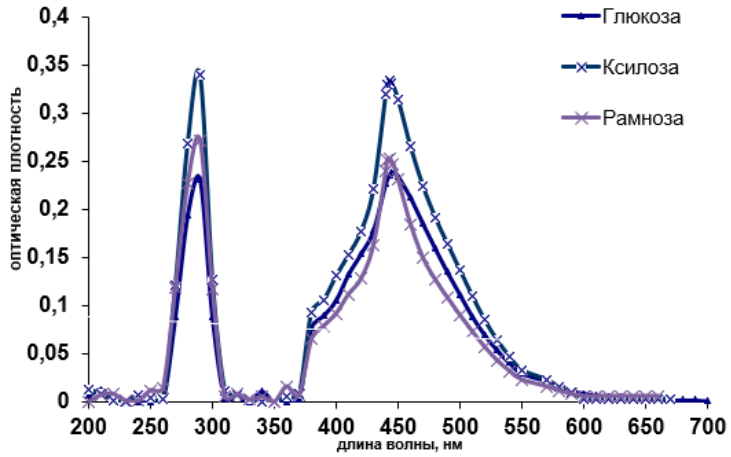


Рисунок 61 – Спектры поглощения продуктов реакции СО простых сахаров с пикриновой кислотой

Для извлечения сахаров, определяемых спектрофотометрическим методом, аналитическую навеску сырья (1,0 г) с размером частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 0,5 мм дважды экстрагировали водой в присутствии хлористоводородной кислоты концентрированной (40:4) в соотношении сырье – экстрагент 1:40 в течение 30 мин, объединяя полученные извлечения, далее pH доводили до 4,0–4,5 40%-ым раствором натрия гидроксида по универсальной индикаторной бумаге в мерной колбе вместимостью 50 мл (исходный раствор) [37]. Рабочий раствор готовили в соответствии с ГФ РФ XIV ФС.2.5.0027.15 «Мать-и-мачехи обыкновенной листья». Раствор сравнения имеет состав аналогичный рабочему за исключением исследуемого извлечения. Оптическую плотность рабочего раствора измеряли относительно раствора сравнения на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) в максимуме поглощения в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно измеряли оптическую плотность 0,02% водного раствора СО глюкозы [37]. Обработку раствора СО проводили аналогично рабочему раствору [164]. Содержание суммы полисахаридов и

свободных сахаров в пересчете на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X, %) вычисляли по формуле (5):

$$X = \frac{A_X \times 100 \times 2 \times m_0 \times P}{A_0 \times m \times (100 - W)}, \qquad (5)$$

где A_X – оптическая плотность рабочего раствора; A_0 – оптическая плотность раствора СО глюкозы, обработанного аналогично испытуемому раствору; m – навеска сырья, г; m_0 - навеска глюкозы, г; W – влажность сырья, %, P – содержание глюкозы в СО, % [164].

Таблица 52 – Результаты определения полисахаридов в цветках каштана конского различных регионов произрастания [37]

№ п/п	Регион произрастания	Содержание, %		
		Осаждаемых полисахаридов (гравиметрия)	Суммы полисахаридов и простых сахаров (пикриновый метод)	
			(Удельный показатель поглощения)	(СО глюкозы)
1	Петрозаводский городской округ	9,78±0,81	10,6 ± 0,72	8,46 ± 0,57
2	Ленинградская область	9,26 ± 0,77	8,02 ± 0,54	6,40 ± 0,43
3	Московская область	12,32 ± 1,10	12,35 ± 0,83	9,85 ± 0,66
4	Воронежская область	12,44 ± 1,11	6,78 ± 0,46	5,40 ± 0,36
5	Волгоградская область	12,95 ± 1,12	11,35 ± 0,77	9,02 ± 0,61
6	Ставропольский край	5,61 ± 0,50	10,85 ± 0,73	8,65 ± 0,58

Значение удельного показателя поглощения комплекса глюкозы с пикриновой кислотой при длине волны 470±5 нм, согласно известной фармакопейной методике ГФ РФ XIV ФС.2.5.0027.15 «Мать-и-мачехи обыкновенной листья» [27, 164] (Таблица 52), легло в основу ещё одного, альтернативного расчётного метода, применённого для количественного определения суммы полисахаридов и восстанавливающих сахаров в сырье.

Содержание суммы связанных и свободных сахаров в цветках каштана конского в пересчете на глюкозу в процентах вычисляли по формуле (6):

$$X = \frac{A \times V_1 \times V_3 \times V_5 \times 100}{m \times E_{1\%}^{1см} \times V_2 \times V_4 \times (100 - W)}, \qquad (6)$$

где А – оптическая плотность раствора В; m – масса сырья, г; V_1 – объема раствора А, мл; V_2 – аликвота из раствора А, мл; V_3 – объем раствора Б, мл; V_4 – аликвота из раствора Б, мл; V_5 – объем раствора В, мл; W – потеря в массе при высушивании сырья, %; $E_{1см}^{1\%}$ – 273,24 – удельный показатель поглощения комплекса СО глюкозы с пикриновой кислотой при 470 ± 5нм.

В результате расчета метрологических характеристик использованных методик (на примере цветков каштана конского, заготовленных на территории Воронежской области) установлено, что средняя относительная ошибка с доверительной вероятностью 95% не превышала 10% (Таблица 53).

Таблица 53 – Метрологическая характеристика результатов количественного определения суммы осаждаемых полисахаридов и суммы полисахаридов и простых сахаров в цветках каштана конского (P = 95 %; n = 5)

$X_{ср}$	S^2	S	$S_{хср}$	ΔX	$\Delta X_{ср}$	ε, %	$\varepsilon_{ср}$, %
Гравиметрия							
12,4441	0,79323	0,89063	0,39830	2,47595	1,10727	19,90	8,9
Пикриновый метод (расчет содержания по удельному показателю поглощения)							
6,7758	0,18985	0,43571	0,17788	1,11978	0,45715	16,53	6,75
Пикриновый метод (расчет содержания с использованием раствора СО глюкозы)							
5,4043	0,12078	0,34753	0,14188	0,89315	0,36463	16,53	6,57

Классический гравиметрический метод, обладая низкой селективностью, как правило, дает завышенные результаты и не позволяет достоверно определить содержание собственно полисахаридов в ЛРС из-за наличия в сырье и других групп БАВ, осаждаемых крепким спиртом. В частности, для цветков каштана конского мешающей определению фракцией БАВ может являться группа тритерпеновых пентациклических сапонинов [37].

При использовании спектрофотометрической методики было установлено, что содержание суммы полисахаридов и свободных простых сахаров в составе

комплекса БАВ цветков каштана конского показало меньшие результаты по сравнению с гравиметрическим определением и составило от 6,78% до 12,35% при использовании расчета по величине удельного показателя поглощения и от 5,40 % до 9,02% при расчете с использованием значений оптической плотности СО глюкозы. Максимальное значение данного показателя наблюдалось в сырье, заготовленном в Московской области (9,02%), наименьшее - в Воронежской области (5,40%). Полученные данные могут объясняться различными климатическими условиями регионов, в которых находится производящее растение и характером изучаемой группы БАВ, являющейся первичным продуктом метаболизма растительной клетки [37].

Таким образом, рекомендуемые числовые значения содержания суммы полисахаридов и свободных простых сахаров для цветков каштана конского могут составлять не менее 5% [37], что может являться достаточно значимым в составе комплекса БАВ как самого сырья, так и экстракционных препаратов на его основе. Так, согласно ФС.2.5.0024 ГФ РФ XV «Липы цветки» [26], рекомендуемая норма содержания суммы полисахаридов и простых сахаров, являющейся целевой группой БАВ в данном ЛРС, составляет не менее 2%.

5.5.1.2. Определение углеводного комплекса биологически активных веществ цветков каштана конского методом ТСХ

На следующем этапе работы проводили разделение сахаров цветков каштана конского, получаемых в результате кислотного гидролиза извлечения, в тонком слое сорбента [38]. Для чего полученную для количественного определения (Глава 5, п. 5.5.1.1) суммарную вытяжку хроматографировали восходящим способом в соответствии с методикой [37, 116, 158, 161, 163], разработанной Тринеевой и др. (Глава 2, п. 2.8).

При хроматографировании 10 мкл извлечений из исследуемого сырья обнаружено 5 зон простых сахаров специфичной окраски (Рисунок 62), среди которых удалось идентифицировать только глюкозу по характерному значению величины R_f в сравнении с достоверным СО [37, 52, 164]. Лишь две зоны

обнаруживались при хроматографировании 5 мкл извлечения. Показатель R_f одной из них был идентичен соответствующему значению для достоверного стандартного образца глюкозы. В составе свободных сахаров цветков каштана конского ксилоза и рамноза обнаружены не были. Параллельно хроматографировали по 2 мкл 1% водных растворов СО моносахаридов: глюкозы, ксилозы, рамнозы. Полученные результаты представлены в Таблице 54. Вид картины разделения был идентичен для извлечений из цветков каштана конского, заготовленного во всех исследуемых областях европейской части РФ [37].

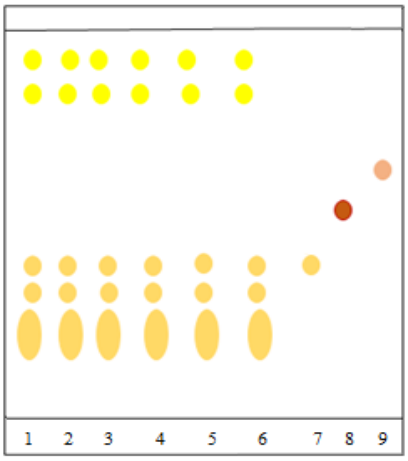


Рисунок 62 – Схема хроматограммы 10 мкл водного извлечения из цветков каштана конского различных регионов произрастания, подвергнутого кислотному гидролизу (1 – Петрозаводский городской округ; 2 – Ленинградская область, 3 – Московская область, 4 – Воронежская область, 5 – Волгоградская область; 6 – Ставропольский край; 7 – СО глюкозы; 7 - СО ксилозы; 9 - СО рамнозы)

Поскольку удалось идентифицировать среди зон обнаруженных свободных сахаров только глюкозу, для более точной оценки хроматографической подвижности, мало чувствительной к влиянию случайных отклонений в условиях проведения эксперимента, в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0001 «Хроматография» ГФ РФ XV, применили величину Rs, представляющая собой отношение величины Rf одного вещества к величине Rf другого вещества, принятого за стандарт [26, 164]. В качестве стандарта выбрана идентифицированная глюкоза, которая была

обнаружена в сырье всех исследуемых регионов заготовки, а также имела оптимальное значение величины R_f в выбранных условиях хроматографирования (Таблица 54).

Таблица 54 – Величины R_f и R_s свободных сахаров каштана конского, рассчитанные по хроматограммам (на примере извлечения из сырья, заготовленного в Воронежской области)

№ трека п/п	R_f±0,02	R_s (стандарт – глюкоза)
1	0,19	0,48
2	0,28	0,7
3	0,40	1,0
4	0,81	2,03
5	0,87	2,18

*R_f СО ксилозы – 0,54 и R_f СО рамнозы – 0,68 в данных условиях

В таблице 54 представлены значения величин R_f и R_s для сахаров, выявленных на хроматограммах изучаемых извлечений. Величина R_s, определенная экспериментально, позволит решать одну из важнейших задач фармацевтического анализа – идентифицировать сахара в различных объектах при отсутствии СО [37, 164].

Таким образом, впервые проведено сравнительное исследование комплекса полисахаридов, а также простых свободных и связанных сахаров в цветках каштана конского различных регионов произрастания с использованием фармакопейных методов гравиметрии и спектрофотометрии. Максимальное содержание суммы свободных и связанных простых сахаров наблюдалось в сырье, заготовленном в Московской области (9,02%), наименьшее - в Воронежской области (5,40%). Проведено разделение комплекса простых сахаров в цветках каштана конского различных регионов произрастания методом ТСХ. Установлено присутствие 5 зон БАВ углеводной природы, среди которых идентифицирована глюкоза. Качественный состав сахаров не меняется в зависимости от климатических и географических особенностей произрастания

производящего растения, при варьировании суммарного количественного содержания полисахаридов и простых свободных и связанных сахаров в сырье.

5.5.2. Аминокислоты и органические кислоты

Недостаточность сравнительных данных о влиянии на накопление данных групп БАВ в цветках каштана конского в зависимости от региона произрастания растения [84, 134] свидетельствует о перспективности исследования, результаты которого представлены в данной Главе [34].

5.5.2.1. Исследование состава аминокислот цветков каштана конского методом ТСХ

Оценивая состав органических кислот в ЛРС, чаще применяются хроматографические методы (бумажная, тонкослойная), ВЭЖХ, а также КЭ [34, 36, 67, 84, 133]. Первым этапом работы являлся предварительный скрининг свободных АК, извлекаемых водой, в цветках каштана конского различных регионов заготовки [38, 52].

Для идентификации АК методом ТСХ полученные извлечения наносили на стартовую линию хроматографических пластинок марки «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А размером 10×15 см (ЗАО «Сорбфил», Краснодарский край, Россия) и хроматографировали в условиях, описанных в Главе 2 (п. 2.8).

Оптимальный объем наносимой пробы водного извлечения из цветков каштана конского, установленный экспериментально, составил 2 мкл. Данный объём проб позволил добиться селективности сорбции, воспроизводимости результатов исследования и удовлетворительного разделения зон на хроматографической пластинке. В качестве раствора сравнения использовали смесь 0,1% водных растворов СО АК (аргинин, пролин, глицин, глутаминовая кислота, валин, метионин, лейцин, фенилаланин), объёмом – 5 мкл. Для каждой хроматографической зоны были рассчитаны величины R_f в сравнении с достоверными СО (Таблица 55).

Извлечения из цветков каштана конского получали следующим образом: около 2,5 г измельченного сырья (точная навеска) с размером частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,5 мм, помещали в коническую колбу

вместимостью 100 мл, прибавляли 30 мл воды очищенной, учитывая коэффициент водопоглощения сырья. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане 30 минут, периодически встряхивая колбу для смывания частиц сырья со стенок. После колбу охлаждали до комнатной температуры и фильтровали полученное извлечение через несколько слоев марли, отжимая частицы сырья, в мерную колбу вместимостью 25 мл. При необходимости доводили объем до метки водой очищенной [36].

Таблица 55 – Интерпретация хроматографической картины разделения зон свободных АК извлечений из цветков каштана конского (на примере сырья, заготовленного в Воронежской области)

№ зоны	Величина R_f ±0,02	Идентификация АК	Заменимость АК
1	0,10	Аргинин	заменимая АК
2	0,15	Неидентифицированная АК	-
3	0,26	Неидентифицированная АК	-
4	0,32	Пролин	заменимая АК
5	0,38	Глицин	заменимая АК
6	0,42	Глутаминовая кислота	заменимая АК
7	0,52	Метионин	незаменимая АК
8	0,62	Лейцин	незаменимая АК
9	0,68	Фенилаланин	незаменимая АК
10	0,84	Неидентифицированная АК	-

В результате анализа в водных извлечениях из цветков каштана конского вне зависимости от региона заготовки сырья обнаружилось 10 зон АК (Рисунок 63).

Качественный состав АК изучаемого сырья из различных регионов оказался идентичен. На хроматограммах извлечений идентифицированы сопоставимые зоны заменимых АК со значениями R_f равными: (0,10 – аргинин; 0,32 – пролин; 0,38 – глицин; 0,42 – глутаминовая кислота) и незаменимых АК со значением величин R_f (0,52 – метионин; 0,62 – лейцин; 0,74 – фенилаланин). А также 3 зоны, неидентифицированных АК со значениями R_f = 0,15; 0,26; 0,84 [36, 38, 42].

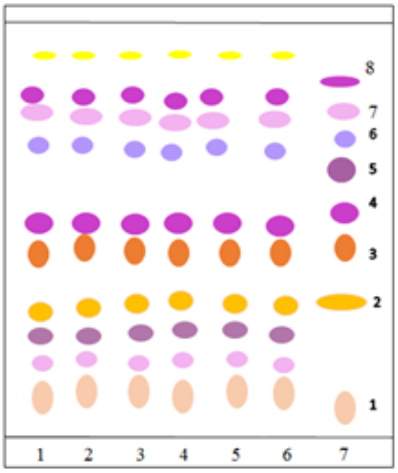


Рисунок 63 – ТСХ-схема разделения зон аминокислот водных извлечений из цветков каштана конского различных регионов произрастания после проявления 1% спиртовым раствором нингидрина: 1 – Воронежская область; 2 – Московская область; 3 – Ставропольский край; 4 – Ленинградская область; 5 - Волгоградская область; 6 – Петрозаводский городской округ; 7 – смесь 0,1%-ных водных растворов СО АК: 1 – аргинин; 2 – пролин; 3 – глицин; 4 – глутаминовая кислота; 5 – валин; 6 – метионин; 7 – лейцин; 8 – фенилаланин

5.5.2.2. Количественное определение аминокислот в цветках каштана конского

Для количественного определения суммы свободных АК в цветках каштана была использована известная унифицированная методика, основанная на измерении оптической плотности продуктов реакции АК водного извлечения из ЛРС с 1% спиртовым раствором нингидрина (Рисунок 64) (Глава 2 п. 2.9) [36, 84, 141].

Параллельно был получен спектр поглощения продуктов реакции 0,025% раствора СО глутаминовой кислоты с аналогичным реагентом. На всех спектрах присутствовал максимум поглощения при длине волны 568 ± 2 нм, что говорит о присутствии свободной глутаминовой кислоты в исследуемых объектах и согласуется с данными ТСХ-анализа (Таблица 55, Глава 5, п. 5.5.2.1) [36, 42, 67].

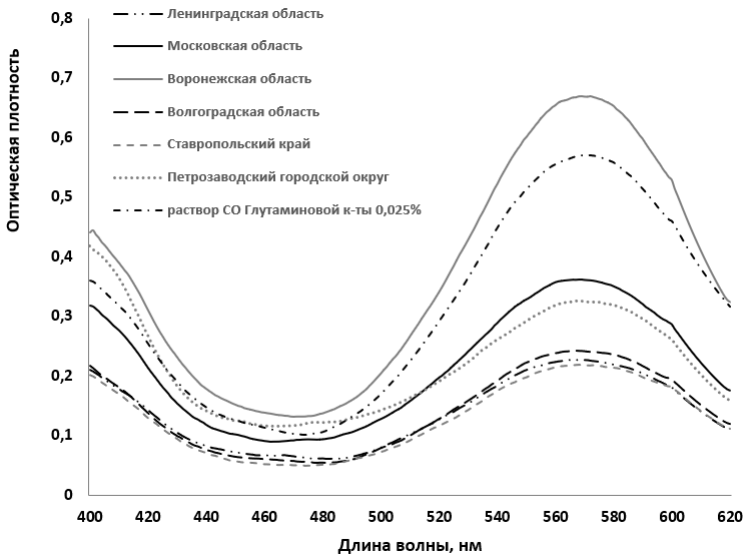


Рисунок 64 – Спектры поглощения продуктов реакции водных извлечений из цветков каштана конского различных регионов произрастания и СО глутаминовой кислоты со спиртовым раствором нингидрина

Содержание суммы свободных АК, в пересчете на глутаминовую кислоту, в цветках каштана конского различных регионов произрастания представлено в Таблице 56. Средняя относительная ошибка с доверительной вероятностью 95% составила около 4,15%, т.е. находится в пределах случайной ошибки (Таблица 57).

Таблица 56 – Результаты определения суммы свободных аминокислот (в пересчете на глутаминовую кислоту и абсолютно сухое сырье) в цветках каштана конского различных регионов произрастания

№ п/п	Регион произрастания	Содержание, %
1	Петрозаводский городской округ	1,63 ± 0,07
2	Ленинградская область	1,18 ± 0,05
3	Московская область	1,94 ± 0,08
4	Воронежская область	3,38 ± 0,14
5	Волгоградская область	1,19 ± 0,05
6	Ставропольский край	1,07 ± 0,04

Содержание суммы свободных АК в цветках каштана конского варьирует в зависимости от региона произрастания (от 1,07% до 3,38%). Можно предположить, что числовые показатели содержания суммы свободных АК могут

зависеть от совокупности естественных и антропогенных факторов в месте произрастания производящего растения.

Таблица 57 – Метрологическая характеристика результатов количественного определения суммы свободных аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту (на примере цветков каштана конского, заготовленных на территории Воронежской области) (P = 95 %; n = 6)

$X_{ср}$	S^2	S	$S_{xср}$	ΔX	$\Delta X_{ср}$	ε, %	$\varepsilon_{ср}$, %
3,384	0,0179	0,1339	0,0547	0,344	0,1405	10,17	4,15

Так, наибольшее содержание суммы свободных аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту наблюдалось в сырье, заготовленном в Воронежской области (3,38%), а минимум содержания обнаружен в цветках каштана, произрастающих в Ставропольском крае (1,07%). Проанализировав совокупность влияния климатических факторов на накопление данной группы БАВ в изучаемом сырье (Рисунок 65), можно сделать заключение об отсутствии прямой зависимости от какого-либо отдельно взятого показателя. Благоприятное оптимальное сочетание условий произрастания, способствующее наибольшему накоплению свободных АК в цветках каштана конского, приходится на зону Центрального Черноземья.

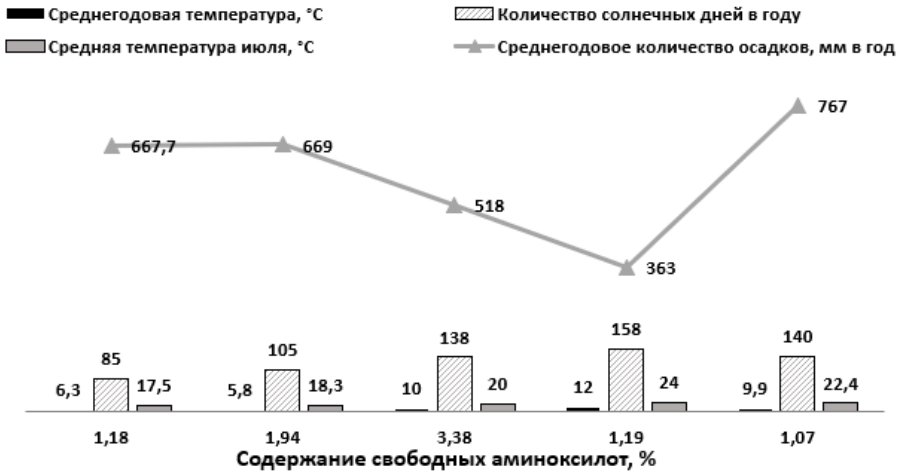


Рисунок 65 – Влияние климатических факторов на накопление свободных АК в цветках каштана конского различных регионов произрастания

На следующем этапе исследования методом КЭ был определен полный состав аминокислот в сырье [34, 67].

Содержание АК в цветках каштана изучаемых регионов произрастания имело размах варьирования от 4,41 до 6,45%. Наибольшее накопление данных групп БАВ было характерно для регионов средней полосы России, снижаясь в сырье, заготовленном как в южных, так и северных регионах. Полученные данные согласуются с результатами оценки накопления в сырье указанных регионов вторичных метаболитов. Та же закономерность установлена для накопления незаменимых АК в общей сумме (Рисунок 66) [34].

Согласно данным Таблицы 58 в цветках каштана конского преобладающими АК являются глутаминовая кислота, пролин, лейцин и аргинин. Максимальное содержание глутаминовой кислоты наблюдалось в цветках каштана, заготовленных в Ленинградской и Московской областях (0,61% и 0,65% соответственно). Пролин преобладал в цветках каштана, произрастающих в Ставропольском крае (0,68%).

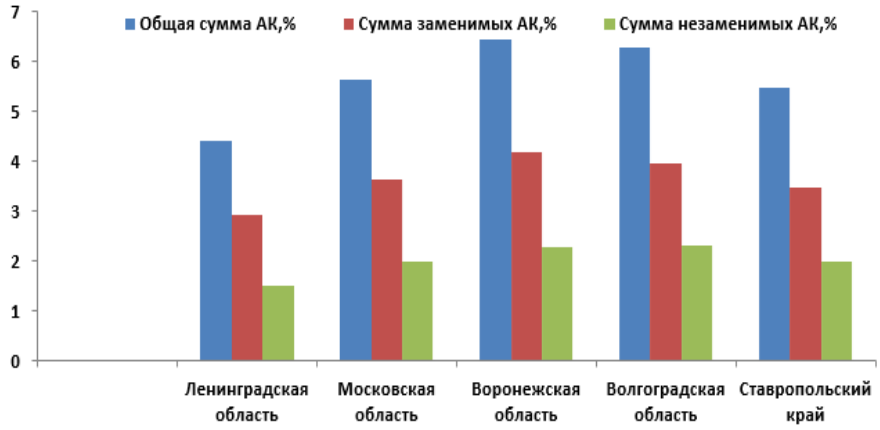


Рисунок 66 – Накопления АК в цветках каштана конского различных регионов произрастания

Наибольшее содержание лейцина наблюдалось в цветках каштана из Волгоградской области (0,79%). В цветках каштана, заготовленных в Воронежской области, преимущественно содержался аргинин (0,72%) (Таблица

58) [34]. Вид электрофореграммы на примере сырья, заготовленного в Ленинградской области, представлен на Рисунке 67.

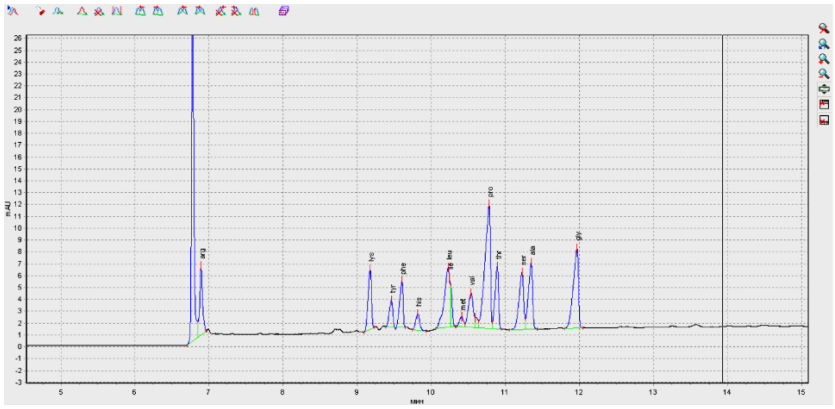


Рисунок 67 – Электрофореграмма разделения АК цветков каштана конского (на примере сырья из Ленинградской области)

Таблица 58 – Сравнительная характеристика аминокислотного состава цветков каштана конского различных регионов произрастания (n=3)

Аминокислота	Содержание аминокислот в цветках, %				
	Ленинградская область	Московская область	Воронежская область	Волгоградская область	Ставропольский край
Аргинин	0,51	0,54	0,72	0,68	0,57
Лизин*	0,19	0,26	0,35	0,30	0,25
Тирозин	0,11	0,15	0,23	0,21	0,15
Фенилаланин*	0,17	0,26	0,41	0,27	0,26
Гистидин	0,15	0,15	0,20	0,09	0,12
Лейцин*	0,44	0,63	0,58	0,79	0,65
Изолейцин*	0,23	0,27	0,19	0,34	0,28
Метионин*	0,03	0,04	0,04	0,05	0,05
Валин*	0,12	0,16	0,29	0,22	0,20
Пролин	0,36	0,63	0,63	0,65	0,68
Треонин*	0,32	0,36	0,41	0,35	0,30
Серин	0,25	0,33	0,38	0,34	0,27
Аланин	0,23	0,32	0,34	0,34	0,31
Глицин	0,24	0,29	0,38	0,34	0,30
Цистеин	0,04	0,05	0,07	0,05	0,04
Глутаминовая кислота	0,61	0,65	0,68	0,61	0,52
Аспарагиновая кислота	0,41	0,56	0,55	0,65	0,52
В сумме	**4,41**	**5,65**	**6,45**	**6,28**	**5,47**

* Незаменимая аминокислота

Для оценки влияния изменчивости накопления АК в цветках каштана, в зависимости от совокупности погодных условий, проводили определение показателя в сырье, заготовленном в разные годы в рамках одного региона произрастания (на примере Воронежской области) [36, 67, 178]. Полученные результаты представлены в Таблице 59.

Таблица 59 – Динамика накопления суммы свободных аминокислот в цветках каштана конского (на примере Воронежской области)

Годы заготовки	Содержание, %	
	Свободных АК в пересчете на кислоту глутаминовую	Свободных и связанных АК
2021-2022	2,25±0,07	7,13±0,36
2023-2024	3,38±0,14	6,45±0,32

Анализ данных таблицы 59 свидетельствует о получении воспроизводимых результатов по накоплению АК, как свободных, так общего состава АК в цветках при заготовке на одной территории в различные годы наблюдений. Содержание свободных АК не было ниже 2%, а суммы АК – 6%.

5.5.2.3. Определение органических кислот в цветках каштана конского

В ходе эксперимента также был изучен профиль свободных органических кислот (ОК) в цветках каштана конского (Таблица 60) методом КЭ (Глава 2 п. 2.9), а также вариабельность данного показателя при заготовке сырья в различных регионах.

Таблица 60 – Профиль свободных органических кислот в цветках каштана конского различных регионов произрастания

Органические кислоты	Содержание органических кислот в цветках, %				
	Ленинградская область	Московская область	Воронежская область	Волгоградская область	Ставропольский край
1	2	3	4	5	6
Щавелевая	0,05	0,04	0,05	0,12	0,03
Муравьиная	Менее 0,15		0,17	Менее 0,15	
Фумаровая	0,005	0,005	0,02	0,01	0,005
Янтарная	0,02	0,01	0,82	0,03	0,03
Масляная	-	-	0,71	-	-
Лимонная	0,30	0,20	1,65	0,27	0,27

Продолжение таблицы 60

1	2	3	4	5	6
Уксусная	1,00	0,85	0,05	0,65	0,67
Пропионовая	2,64	2,18	0,03	2,36	2,31
Молочная	Менее 0,12		0,95	Менее 0,12	
Бензойная	0,005	0,002	0,05	7,92	0,003
Сорбиновая	0,01	0,01	0,05	0,02	0,02
Яблочная	0,007	Менее 0,05	0,15	0,06	0,01
В сумме	**4,04**	**3,30**	**4,70**	**11,44**	**3,35**

Суммарно, в цветках каштана конского идентифицировано от 8 до 12 кислот, в зависимости от региона произрастания. Однако для данной группы БАВ в изучаемых образцах не прослеживалось определенной тенденции накопления. Выявлено, что содержание муравьиной и молочной кислот в цветках каштана всех исследуемых регионов ниже предела обнаружения за исключением сырья из Воронежской области. Так, цветки каштана конского, заготовленные в Ленинградской, Московской, Волгоградской областях и Ставропольском крае, демонстрировали значительное накопление пропионовой кислоты (2,64%, 2,18%, 2,36% и 2,31% соответственно). Выросшие в Воронежской области цветки каштана преимущественно накапливали янтарную, масляную, лимонную и молочную кислоты (0,819%, 0,711%, 1,650% и 0,95% соответственно). Было установлено, что для цветков каштана из Волгоградской области содержание щавелевой кислоты относительно других регионов было на порядок больше [34].

На следующей стадии исследования провели оценку количественного содержания суммы органических кислот в цветках каштана конского различных регионов произрастания с помощью классической фармакопейной титриметрической методики в пересчете на яблочную кислоту, в соответствии с ФС.2.5.0093 ГФ РФ XV изд. «Рябины обыкновенной плоды» [26].

Установлено, что самые высокие результаты показали цветки, заготовленные на территории регионов с контрастными климатическими условиями: Ставропольский край (0,65%), Волгоградская область (0,70%), Петрозаводский городской округ (0,72%) (Таблица 61) [53].

Таблица 61 – Содержание суммы органических кислот в цветках каштана конского различных регионов произрастания

Регион произрастания	Содержание, %		
	В пересчете на лимонную кислоту	В пересчете на янтарную кислоту	В пересчете на яблочную кислоту
Петрозаводский городской округ	0,69±0,04	0,64±0,04	0,72±0,04
Ленинградская область	0,54±0,03	0,50±0,03	0,57±0,03
Московская область	0,54±0,03	0,50±0,03	0,56±0,03
Воронежская область	0,68±0,04	0,63±0,04	0,57±0,03
Волгоградская область	0,66±0,04	0,61±0,03	0,70±0,04
Ставропольский край	0,62±0,03	0,57±0,03	0,65±0,04

Учитывая, что содержание яблочной кислоты в цветках каштана из Воронежской области достаточно невысоко, установлена целесообразность пересчета на альтернативные мажорные компоненты, в том числе и для других регионов в рамках адаптивного подхода на этапе предварительного хемотипирования сырья. Поскольку предсказать доминирующую кислоту в сырье из конкретного региона невозможно, это позволяет обеспечить репрезентативность данных о действительном содержании суммы органических кислот в сырье из различных регионов.

Результаты статистической обработки экспериментально полученных данных на примере цветков каштана конского, заготовленных на территории Воронежской области, приведены в Таблице 62.

Таблица 62 – Метрологическая характеристика результатов количественного определения суммы органических кислот, в пересчете на яблочную кислоту (на примере цветков каштана конского, произрастающих на территории Воронежской области) (P = 95 %; n = 6)

$X_{ср}$	S^2	S	$S_{xср}$	ΔX	$\Delta X_{ср}$	ε, %	$\varepsilon_{ср}$, %
0,57	0,0009	0,03004	0,0123	0,077	0,032	13,57	5,54

Сравнительный анализ межгодовой динамики накопления органических кислот в цветках каштана конского (на примере сырья, заготовленного в Воронежской области) выявил статистически значимые колебания количественных показателей (Таблица 63).

Таблица 63 – Динамика накопления суммы ОК в цветках каштана

Год заготовки	Содержание, % [68]	
	В пересчете на яблочную кислоту	В пересчете на лимонную кислоту
2021	1,15±0,02	1,65±0,04
2023	0,57±0,03	0,68±0,04

Установленные различия могут быть обусловлены комплексным воздействием погодных условий вегетационных периодов, включая температурный режим, количество осадков и инсоляцию. Полученные данные подчеркивают необходимость учета метеорологических факторов при планировании заготовительных работ и стандартизации ЛРС.

Получены сопоставимые значения, также демонстрирующие благоприятные условия для накопления АК и ОК в цветках, заготовленных от растений, произрастающих в Воронежской области [34, 67, 84, 134].

Для определения аскорбиновой кислоты в общей сумме титруемых органических кислот, также воспользовались традиционной титриметрической методикой с применением в качестве титранта 0,001 М раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия (Глава 2, п. 2.9). Установлено, что больше всего аскорбиновой кислоты (Таблица 64) накапливалось в цветках каштана конского, заготовленных в Воронежской (0,0476 %) и Московской (0,0473%) областях, а также в Петрозаводском городском округе (0,0488%) [53].

При этом все изучаемые регионы произрастания показали примерно равное содержание витамина С в сырье [53].

Таблица 64 – Результаты определения содержания аскорбиновой кислоты в цветках каштана конского различных регионов произрастания

Регион произрастания	Содержание аскорбиновой кислоты, %
Петрозаводский городской округ	0,05±0,004
Ленинградская область	0,05±0,003
Московская область	0,05±0,004
Воронежская область	0,05±0,004
Волгоградская область	0,04±0,003
Ставропольский край	0,04±0,003

Результаты статистической обработки экспериментально полученных данных на примере цветков каштана конского, заготовленных на территории Воронежской области приведены в Таблице 65.

Таблица 65 – Метрологическая характеристика метода анализа (P = 95 %; n = 6)

$X_{ср}$	S^2	S	$S_{хср}$	ΔX	$\Delta X_{ср}$	ε, %	$\varepsilon_{ср}$, %
0,0476	0,0000112	0,0034	0,0014	0,0086	0,0035	18,08	7,39

Также в рамках существующей теоретической концепции: «была проведена оценка динамики накопления аскорбиновой кислоты в цветках каштана конского в различные вегетационные периоды» [134]. Исследование выявило статистически значимые межгодовые колебания содержания витамина С при сохранении фенологической фазы заготовки сырья (Таблица 66).

Таблица 66 – Динамика накопления аскорбиновой кислоты в цветках каштана (на примере сырья, заготовленного в Воронежской области)

Год заготовки	Аскорбиновая кислота, %
2021	0,033±0,007
2023	0,048±0,004

Полученные данные демонстрируют влияние климатических факторов и условий конкретного вегетационного сезона на биосинтез аскорбиновой кислоты, что необходимо учитывать при разработке критериев для стандартизации сырья [164].

5.6. Оценка динамики накопления биологически активных веществ в цветках каштана конского

На территории РФ отсутствуют промышленные посадки каштана конского для заготовки сырья с целью производства ЛРП и БАД на основе цветков. В данном контексте особенно важной научно-практической задачей выступает оптимизация эксплуатации культурных насаждений каштана конского, направленная на рациональное природопользование и обеспечение стабильного получения стандартизированного сырья. Решение данной задачи требует разработки научно обоснованных норм заготовки, оптимизации сроков и методов сбора цветков, а также внедрения ресурсосберегающих технологий хранения и переработки сырья.

Для выбора оптимального срока сбора сырья, цветки заготавливали с учётом фаз цветения растения, были выделены три ключевых периода сбора: фаза бутонизации и начала цветения – первая декада мая; фаза массового цветения – середина–конец мая; фаза завершения цветения – конец мая–начало июня (Глава 2 п. 2.16).

Определение экстрактивных веществ проводили в соответствии с требованиями, приведенными в ГФ РФ XV изд. (Глава 2, п. 2.7), в качестве экстрагента выступал спирт этиловый 70%, как извлекающий большее количество целевых групп БАВ – флавоноидов и сапонинов по ранее установленным экспериментальным данным, (Глава 5, п. 5.3.1.1; п. 5.4.2.1) [50]. Для определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в цветках каштана конского использовали ранее разработанную и валидированную методику их количественного анализа методом дифференциальной спектрофотометрии (Глава 5 п. 5.3.1.1) [50]. Для определения суммы сапонинов в пересчете на β-эсцин использовали разработанную и валидированную спектрофотометрическую методику.

По результатам исследования динамики накопления БАВ в цветках каштана конского (Таблица 67), в зависимости от фазы заготовки, было выявлено, что наибольшее содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (3,82±0,12%)

отмечено в фазе бутонизации и начала цветения. В период массового цветения содержание флавоноидов несколько снижается до 3,51±0,11%, оставаясь значительно выше рекомендуемого минимального значения в 2% [50]. Максимальное содержание сапонинов наблюдалось в период массового цветения (2,16±0,03%). Однако, следует отметить, что для всех фенологических фаз заготовки было характерно содержание суммы сапонинов выше рекомендуемого порогового значения в 1%. Особый интерес представляет изменчивость содержания экстрактивных веществ, достигающих максимальной концентрации в период бутонизации и начала цветения (33,48±0,22%). Фаза массового цветения, демонстрируя несколько сниженные, но статистически высокие показатели по содержанию экстрактивных веществ (30,2±0,90%) и также представляет значительный интерес для заготовки.

Таблица 67 – Сводные данные по результатам исследования состава БАВ цветков каштана конского, заготовленных на территории Воронежской области в зависимости от фенологической фазы цветения растения [45]

№ п/п	Фенологическая фаза	Сумма флавоноидов, %	Сумма сапонинов, %	Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 70% этанолом, % [45]
1	Бутонизация и начало цветения	3,82±0,12	1,24±0,02	33,48±0,22
2	Массовое цветение	3,51±0,11	2,16±0,03	30,20±0,90
3	Завершение цветения	2,25±0,07	1,85±0,02	22,85±1,75

Содержание БАВ в эту фазу остается на высоком уровне, что в комплексе с максимальной биомассой сырья делает сбор экономически и технологически целесообразным. Именно в фазы бутонизация и начало цветения, а также массового цветения наблюдается пик биосинтетической активности растения. Такой подход унифицирует процесс заготовки, обеспечивает стабильно высокое качество сырья и соответствует принципам рационального природопользования.

На следующем этапе работы нами была проведена оценка количественного содержания флавоноидов и сапонинов в цветках каштана конского заготовки 2023 и 2024 года соответственно, при хранении в режиме реального времени, для

обоснования рекомендуемых сроков хранения сырья (Рисунок 68, 69). Результаты двухлетнего наблюдения за стабильностью сырья (Рисунок 70, 71), выявили постепенное снижение содержания суммы флавоноидов с 3,43% (начальный уровень – 2023 год) до 2,96% после двух лет хранения – 2025 год и сапонинов с 1,28% (начальный уровень – 2024 год) до 1,17% после двух лет хранения – 2026 год.

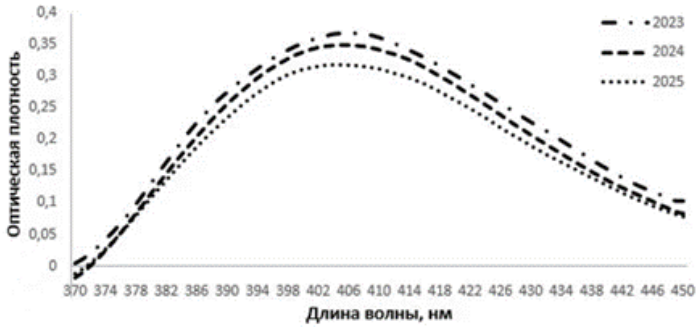


Рисунок 68 – Вид дифференциальных спектров поглощения комплекса флавоноидов цветков каштана конского с алюминием в различные годы наблюдений [45]

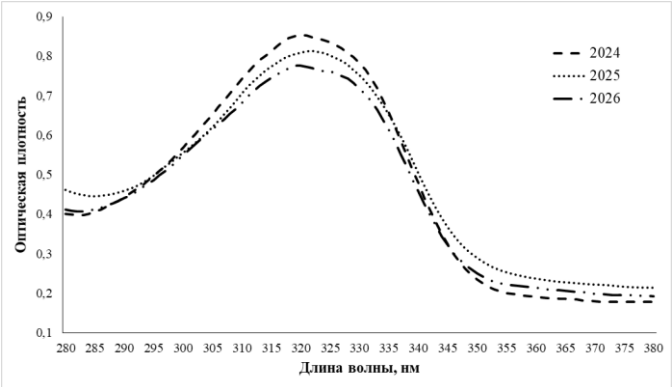


Рисунок 69 – Вид спектров поглощения продуктов взаимодействия сапонинов цветков каштана конского с кислотой серной концентрированной в различные годы наблюдения

Среднегодовое уменьшение показателя составило 0,24% для флавоноидов и 0,06% для сапонинов, что свидетельствует о достаточной сохранности исследуемых БАС. Следует подчеркнуть, что даже через 24 месяца хранения

содержание флавоноидов (2,96%) и сапонинов (1,17%) превышало минимально допустимые рекомендованные уровни в 2% и 1% соответственно, обоснованные и рекомендованные выше в работе в качестве критериев стандартизации данного вида сырья.

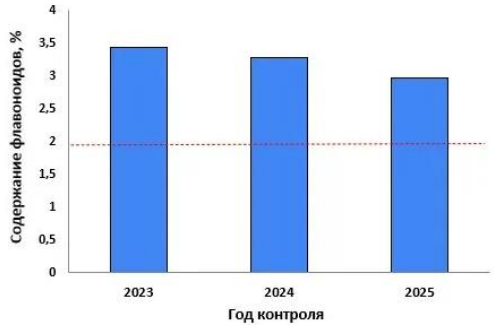


Рисунок 70 – Динамика содержания флавоноидов в цветках каштана конского в процессе хранения сырья [45]

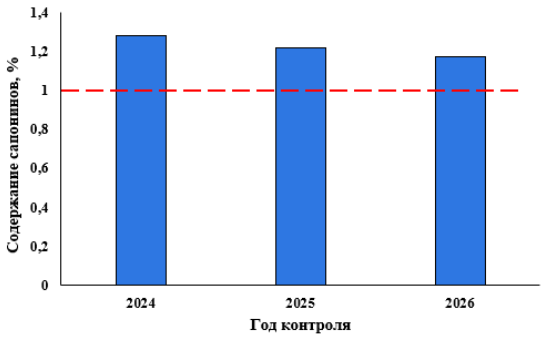


Рисунок 71 – Динамика содержания сапонинов в цветках каштана конского в процессе хранения сырья

Полученные данные подтверждают возможность установления срока годности цветков каштана конского в течение двух лет после заготовки при соблюдении оптимальных условий хранения. Таким образом, готовое сырьё упаковывают в тюки или кипы. Упаковочная тара должна быть крепкой, сухой, чистой, без посторонних запахов. Сырье хранится на стеллажах, в сухом, хорошо проветриваемом помещении, защищённом от воздействия прямого солнечного света при температуре не более 25 °С и относительной влажности воздуха не более 65 %. Срок годности 2 года [45]. По результатам работы предложена схема

заготовки цветков каштана конского (Рисунок 72), а также утверждена инструкция по заготовке и сушке ЛРС (Приложение 2).

5.7. Оценка взаимного влияния на накопление биологически активных веществ в цветках каштана конского различных регионов произрастания

Известно, что пути биосинтеза БАВ в растения взаимосвязаны между собой. Так накопление одной группы БАВ растением во многом определяется присутствием других БАВ. Взаимосвязи между различными группами БАВ могут быть антагонистическими или синергическими. Антагонизм приводит к торможению синтеза одной группы при накоплении другой, а синергизм – к взаимному стимулированию биосинтеза. Для оценки способности различных исследованных групп БАВ снижать или повышать синтез друг друга в цветках каштана конского на основе полученных экспериментальных данных были рассчитаны непараметрические коэффициенты парной корреляции Спирмена и коэффициенты парной линейной корреляции Пирсона, как наиболее подходящие для оценки скошенных распределений [28].



Рисунок 72 – Технологическая схема заготовки каштана конского обыкновенного цветков

Результаты расчета представлены в Приложении 9 (Таблицы 1 – 2). Полученные результаты оценивали по шкале Чеддока, в соответствии с которой значения коэффициента меньше 0,3 - признак слабой тесноты связи; значения более 0,3, но менее 0,7 - признак умеренной тесноты связи, а значения 0,7 и более - признак высокой тесноты связи. Отрицательное значение коэффициента свидетельствует о наличии антагонистического влияния групп БАВ друг на друга [108].

В Таблицах 1 – 2 Приложения 9 жирным шрифтом выделены коэффициенты корреляции, подтверждающие наличие высокой взаимосвязи содержания БАВ в цветках каштана конского. Согласно данным Таблиц 1 – 2 Приложения 9, наблюдается сильное влияние накопления флавоноидов на концентрирование в цветках дубильных веществ, а также стеринов - на ТС. Установлено, что полисахариды не оказывают влияния на накопление флавоноидов, а биосинтез АК не влияет заметно на накопление фитостеринов. Выявлена обратная связь для следующих пар групп БАВ стерины/флавоноиды (по двум группам коэффициентов), стерины/антоциановые соединения (по двум группам коэффициентов), ТС на полифенольные группы БАВ (флавоноиды, дубильные вещества и антоциановые соединения), сахара на дубильные вещества и антоциановые соединения. АК, как первичные метаболиты – исходные компоненты биосинтеза вторичных метаболитов связаны антагонистическими связями с полифенольными соединениями и ТС, а органические кислоты – с флавоноидами, антоцианами и полисахаридами растения.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. При определении показателя «Экстрактивные вещества» показано высокое содержание фракции БАВ в цветках, извлекаемых спиртами 40-70% концентрации. На основании региональной вариабельности значений данного показателя предложен критерий для включения в проект ФС (содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 70% спиртом не менее 25%).

2. Проведенный первичный качественный фитохимический анализ цветков каштана конского обыкновенного подтверждает наличие флавоноидов, спирторастворимых сапонинов, антоциановых соединений, полисахаридов в форме слизей, органических кислот, аскорбиновой кислоты и дубильных веществ.

3. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в цветках каштана конского методом дифференциальной спектрофотометрии. Определена эколого-географическая вариабельность накопления данной группы БАВ в сырье (от 3,30 до 4,55%). Методом ТСХ-анализа установлено, что флавоноидный комплекс цветков различных регионов идентичен и представлен четырнадцатью БАВ, среди которых установлено присутствие рутина, кверцетина и апигенина. Рекомендованы унифицированные критерии оценки качества данного сырья для проекта ФС «Цветки каштана конского обыкновенного» (Приложение 1) по показателям «Идентификация. Определение основных групп биологически активных веществ» и «Количественное определение» суммы флавоноидов в пересчете на рутин (не менее 2%).

4. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы лейкоантоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид в цветках каштана конского методом спектрофотометрии. Вариабельность накопления данной группы БАВ в сырье в зависимости от совокупности эколого-географических факторов региона произрастания составила от 1,27 до 1,72%. Методом ТСХ в подкисленных спиртовых экстрактах из цветков каштана конского выявлено три зоны антоциановой природы для всех исследуемых регионов заготовки сырья.

5. Методом ГХ/МС обнаружено присутствие в компонентном составе липофильной фракции сырья растительного стерина – γ-ситостерола. Методом спектрофотометрии установлено содержание в цветках суммы фитостеринов, которое, в зависимости от региона произрастания, варьировало от 7,06% до 12,97%.

6. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы ТС в пересчете на β-эсцин в цветках каштана конского методом спектрофотометрии. Определена региональная вариабельность накопления данной группы БАВ в сырье (от 1,27 до 2,95%). Проведено разделение суммы сапонинов, идентифицирован β-эсцин, а также установлена идентичность качественного состава сапонинов в цветках каштана конского различных регионов произрастания методом ТСХ. Рекомендованы унифицированные критерии оценки качества данного сырья для проекта ФС «Конского каштана обыкновенного цветки» (Приложение 1) по показателям «Идентификация. Определение основных групп биологически активных веществ» и «Количественное определение» суммы ТС в пересчете на β-эсцин (не менее 1%).

7. Впервые проведено сравнительное исследование комплекса полисахаридов и простых свободных и связанных сахаров в цветках каштана конского различных регионов произрастания с использованием фармакопейных методов гравиметрии и спектрофотометрии. Вариабельность содержания суммы полисахаридов и простых сахаров наблюдалась в диапазоне 5,40-9,02%. Установлено методом ТСХ, что качественный состав моносахаров не меняется в зависимости от климатических и географических особенностей произрастания производящего растения.

8. Методом ТСХ исследован качественный состав свободных АК цветков каштана конского. Во всех образцах сырья наблюдалось на хроматограммах по 10 зон АК, среди которых идентифицированы заменимые АК (аргинин; пролин; глицин; глутаминовая кислота) и незаменимые АК (метионин; лейцин; фенилаланин). Определено количественное содержание суммы свободных АК в пересчете на глутаминовую кислоту методом дифференциальной спектрофотометрии в зависимости от региона произрастания (от 1,07% до 3,38%).

9. Был изучен полный аминокислотный состава и профиль свободных органических кислот в цветках каштана конского с помощью КЭ. Полный состав АК в цветках каштана изучаемых регионов произрастания имел размах варьирования от 4,41 до 6,45%. Установлено, что содержание аскорбиновой

кислоты в сырье из всех изучаемых регионов статистически значимо не различается (0,04-0,05%), тогда как накопление других органических кислот, по данным количественного анализа, подвержено региональной вариабельности.

10. Наибольшее содержание дубильных веществ в пересчете на танин было установлено в цветках, заготовленных на территории Московской (6,5%) области и Петрозаводского городского округа (5,38%).

11. На основании исследований установлены оптимальные сроки заготовки цветков каштана конского в период от начала бутонизации и цветения до массового цветения в сухую погоду, когда содержание целевых БАВ (сапонинов и флавоноидов) достигает максимума. Даны рекомендации по заготовке, сушке, сроку и условиям хранения сырья.

12. Накопление различных групп БАВ цветками каштана конского имеет ряд особенностей. Установлено синергическое взаимодействие между полифенольными соединениями, а также фитостеринами и ТС. Подтверждено, что вторичные метаболиты растений (БАВ фенольной и тритерпеновой природы) проявляет антагонистическое действие на накопление в цветках первичных метаболитов - аминокислот и полисахаридов. Антагонизмом с точки зрения биосинтеза характеризуются фенольные и тритерпеновые группы БАВ.

ГЛАВА 6. ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ ВОЗМОЖНЫХ ВИДОВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЦВЕТКОВ КАШТАНА КОНСКОГО И ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ИХ ОСНОВЕ

6.1. Прогноз фармакологической активности биологически активных веществ цветков каштана конского методом *in silico*

Прогноз вероятной фармакологической активности и возможных токсических эффектов для целевых БАВ сырья был выполнен с использованием онлайн платформы PASS online (Глава 2, п. 2.11) [81, 129, 249]. В качестве целевых соединений выбраны рутин и β-эсцин – компоненты, применяемые при стандартизации сырья, что обеспечивает сопоставимость результатов прогноза с показателями качества и ожидаемым фармакологическим профилем [46, 50]. Процианидин B_2 был включён в перечень БАВ для *in silico* прогнозирования, поскольку данное соединение является биосинтетическим предшественником антоцианов (в т.ч. цианидина), значительное содержание которых ранее установлено в цветках каштана (Глава 5, п.5.3.2). Это позволяет более полно оценить вклад полифенольной фракции в формирование прогнозируемого спектра фармакологической активности растительного сырья. γ-Ситостерол и эргостерин дополнительно включены как представители фитостеринов цветков, наличие которых подтверждено в составе аналитическими методами [149]. Группа растительных стеринов (γ-ситостерол и эргостерин) в компонентном составе цветков каштана конского на этапе предварительных скрининговых *in silico* исследований показала терапевтический потенциал. Данные БАВ обладают с высокой вероятностью проявления гепатопротекторной, антигиперхолестеринемической и гиполипидемической активностями. Причем оба соединения схожи по активности в качестве антагониста холестерина, однако гепатопротекторным эффектом обладает только γ-ситостерол [149].

Проведённый *in silico* анализ позволил спрогнозировать свыше 200 различных видов активностей. Наиболее значимые из них представлены в Приложении 10 (таблицы 1 и 2); там же для каждого вида приведены оценки

вероятности проявления (Pa) фармакологических или токсических эффектов в эксперименте, а также отсутствия активности (Pi). Пороговым значением, выше которого активность рассматривалась как существенная, служило Pa > 0,7. Среди спрогнозированных фармакологических активностей наиболее важными можно выделить: антиоксидантный, мембранопротекторный, вазопротекторный, антигиперхолистеринэмический, гепатопротекторный, иммуностимулирующий, противовоспалительный, антитромбический, противоотёчный, антибактериальный, противоопухолевый эффекты. Из весомых токсических побочных эффектов следует выделить: нарушение репродуктивной функции, нефротоксичность, эмбриотоксичность, гематотоксичность, расстройства сна и нарушения работы ЖКТ [252].

Ввиду того, что 40% исследуемых БАВ показали *in silico* антиокислительную активность (АОА), а также значительного содержания фенольной фракции в цветках (Глава 5, п 5.3.1. и п. 5.3.2), на следующем этапе проводили оценку АОА водно-спиртовых извлечений из изучаемого сырья.

6.2. Оценка антиокислительной активности водных извлечений из цветков каштана конского

Согласно данным ряда авторов, экстракты на основе семян каштана конского обладают довольно выраженной АОА. По некоторым данным среди надземных органов растения наиболее высокую АОА показал экстракт коры каштана конского [244, 257, 261]. Однако, на сегодняшний день, в научном поле наблюдается небольшое количество работ, посвященных изучению АОА цветков каштана конского [62, 75]. Несмотря на растущий интерес к природным антиоксидантам и достаточное количество методик для оценки АОА растительного сырья, данный аспект остается недостаточно изученным, что подчеркивает актуальность дальнейших исследований данного ЛРС [84, 134].

Оценка АОА проводилась в соответствии с известной спектрофотометрической методикой (Глава 2, п. 2.11), запатентованной Тринеевой О.В. с соавт., основанной на взаимодействии извлечения из ЛРС, содержащего БАВ-восстановители с растворами медиаторной системы,

состоящей из 0,002 М раствора ферроцианида калия и 0,002 М раствора феррицианида калия, взятых в соотношении 1:1. Под действием БАВ, способных восстанавливать Fe^{3+} в Fe^{2+}, происходит снижение содержания в растворе $[Fe(CN)_6]^{3-}$ и рост концентрации $[Fe(CN)_6]^{4-}$, что сопровождается гипохромным смещением максимума поглощения при длине волны 420 нм на спектре поглощения медиаторной пары (Рисунок 73). Способ позволяет проводить оценку АОА ЛРС и суммарного содержания в нем БАВ-антиокислителей (БАВ-АО) в пересчете на кислоту аскорбиновую и стандартизировать ЛРС по содержанию данных БАВ. Методика отличается достаточной чувствительностью (1×10^{-5} г/мл), экономичностью, доступностью и экспрессностью [75].

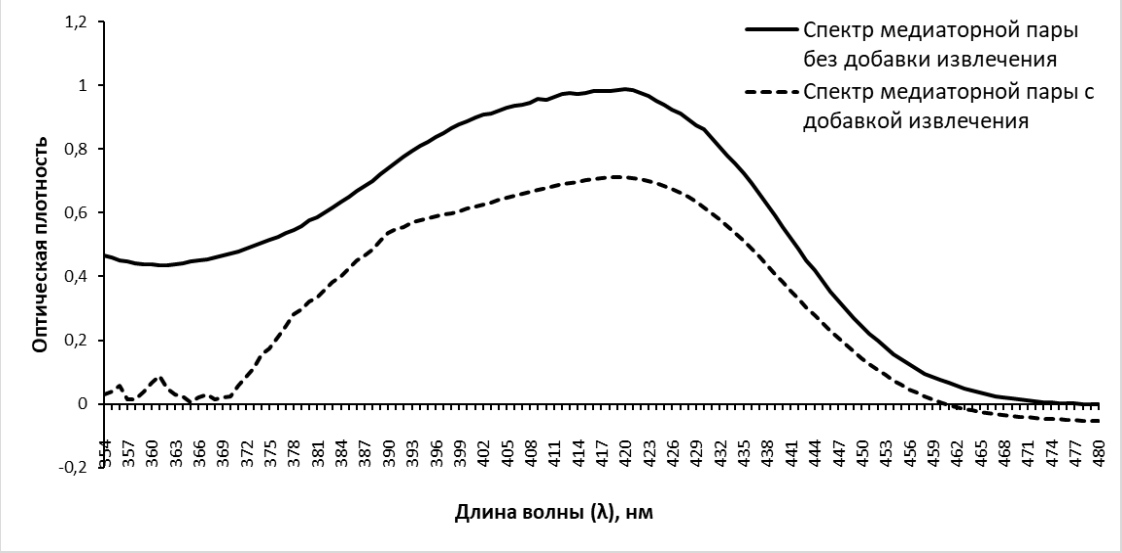


Рисунок 73 – Спектр поглощения медиаторной пары до и после добавления извлечений из цветков каштана конского

На первом этапе работы были установлены области линейности методики и построен калибровочный график, демонстрирующий обратно пропорциональную зависимость величины оптической плотности раствора медиаторной пары от концентрации добавленного стандартного раствора аскорбиновой кислоты (Рисунок 74).

График характеризовался наличием точки перегиба и был разделен на 2 участка с коэффициентами корреляции в каждом (R^2>0,99).

На следующем этапе работы проводили определение АОА цветков каштана конского различных регионов произрастания. Вид спектров поглощения медиаторной пары при взаимодействии с БАВ-восстановителями, содержащимися в цветках каштана конского различных регионов произрастания представлен на Рисунке 75.

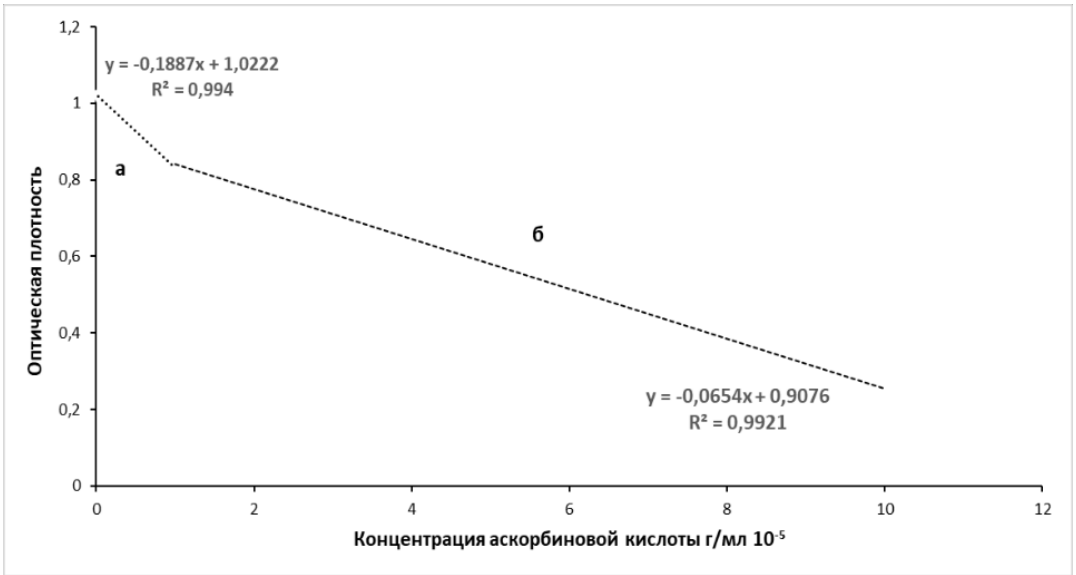


Рисунок 74 – Калибровочные графики: а – область концентрации аскорбиновой кислоты от 0,01 до 1 г/мл $\times 10^{-5}$, б – область концентрации аскорбиновой кислоты от 1 до 10 г/мл $\times 10^{-5}$

Отталкиваясь от полученных значений оптической плотности раствора медиаторной пары после добавления извлечений из сырья, для расчетов использовали калибровочный график. Вычислили АОА извлечения в пересчете на кислоту аскорбиновую в г/мл раствора по формулам (7) и (8) в зависимости от областей концентрации аскорбиновой кислоты:

$$\text{АОА} \cdot 10^{-5}, \frac{\text{г}}{\text{мл}} = \frac{1{,}022 - \text{А}}{0{,}1887}, \qquad (7)$$

$$\text{АОА} \cdot 10^{-5}, \frac{\text{г}}{\text{мл}} = \frac{0{,}9076 - \text{А}}{0{,}0654}, \qquad (8)$$

где А – оптическая плотность исследуемого раствора в максимуме поглощения.

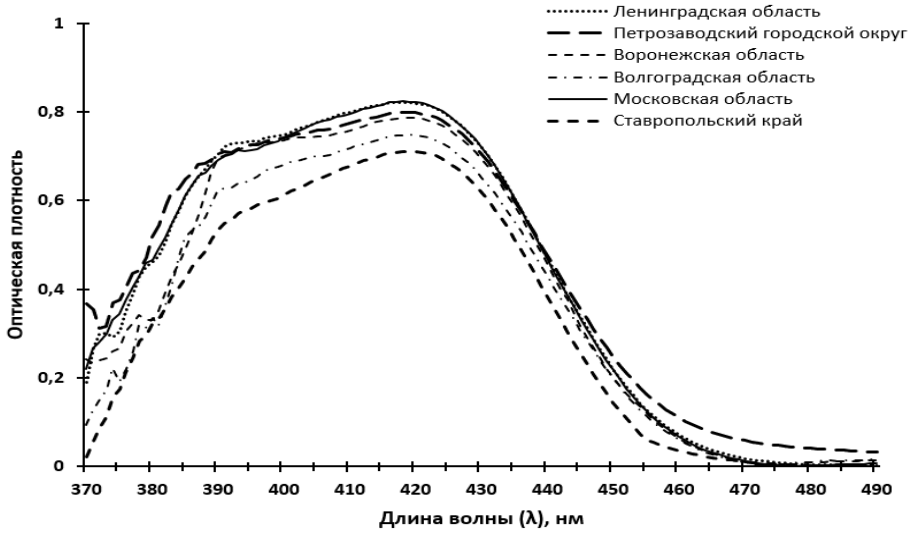


Рисунок 75 – Спектр поглощения извлечений из цветков каштана конского различных регионов произрастания в присутствии медиаторной пары $[Fe(CN)_6]^{3-}$ и рост концентрации $[Fe(CN)_6]^{4-}$

Суммарное содержание БАВ-АО в сырье в пересчете на кислоту аскорбиновую и абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле (9):

$$\Sigma \text{АО}, \% = \frac{\text{АОА} \cdot 60 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{\text{а} \cdot 20 \cdot (100 - \omega)}, \qquad (9)$$

где АОА – вычисленная ранее по формуле (7) или (8), г/мл; ω – потеря в массе при высушивании исследуемого сырья, %; а – точная навеска сырья

Результаты определения АОА цветков конского каштана представлены в Таблице 68 [75]. Результаты статистической обработки экспериментально полученных данных на примере цветков каштана конского, заготовленных на территории Воронежской области приведены в Таблице 69.

Таблица 68 – АОА и суммарное содержание БАВ-АО в пересчете на аскорбиновую кислоту и абсолютно сухое сырье

Регион произрастания	АОА, г/мл ×10-5	Сумма антиокислителей (АО) в пересчете на аскорбиновую кислоту и абсолютно сухое сырье, %	Содержание аскорбиновой кислоты (фармакопейный метод), % [27, 53]
1	2	3	4
Петрозаводский городской округ	1,06±0,07	0,18±0,01	0,05±0,003

Продолжение таблицы 68

1	2	3	4
Ленинградская область	1,46±0,10	0,25±0,02	0,05±0,003
Московская область	0,85±0,06	0,14±0,01	0,05±0,004
Воронежская область	1,13±0,08	0,19±0,01	0,05±0,004
Волгоградская область	1,68±0,12	0,28±0,02	0,04±0,003
Ставропольский край	1,81±0,13	0,31±0,02	0,04±0,003

Таблица 69 – Метрологическая характеристика результатов количественного определения суммы АО в пересчете на аскорбиновую кислоту в цветках каштана конского (P = 95 %; n = 5)

$X_{ср}$	S^2	S	$S_{xср}$	ΔX	$\Delta X_{ср}$	ε, %	$\varepsilon_{ср}$, %
0,0712	0,000015	0,003955	0,001766	0,010995	0,004908	15,44	6,89

Наибольшее содержание АО в пересчете на аскорбиновую кислоту наблюдали в сырье из Ставропольского края ($1,81\times10^{-5}$ г/мл; 0,31±0,02%), Волгоградской ($1,68\times10^{-5}$ г/мл; 0,28±0,02%) и Ленинградской областей ($1,46\times10^{-5}$ г/мл; 0,25±0,02%). Самая низкая АОА зафиксирована для извлечений из сырья, заготовленного в Московской области ($0,85\times10^{-5}$ г/мл), что почти в 2,1 раза меньше, чем в Ставропольском крае. Содержание суммы АО в пересчете на аскорбиновую кислоту в данном регионе составило (0,14±0,01%), что на 47% меньше, чем в лидирующих регионах [75].

Более высокие показатели АОА извлечений из цветков каштана, произрастающих в самых южных (Ставропольский край и Волгоградская область) и самых северных (Ленинградская область) из наблюдаемых областей, могут быть связаны с неблагоприятными условиями (по сравнению с регионами средний полосы России). Экстремальные факторы (засушливость, низкие среднегодовые температуры и качество почв) стимулируют растения к синтезу защитных соединений, таких как полифенолы, каротиноиды, витамины, обладающих антиокислительными свойствами. Оценивая влияние фактора антропогенной нагрузки, можно также сказать, что эти регионы менее урбанизированы, что

создает более благоприятные условия для роста растений и накопления вторичных метаболитов. ЛРС из Московской области демонстрирует самые низкие показатели содержания веществ, препятствующих окислению, что, вероятно, обусловлено значительным экологическим давлением, вызванным деятельностью человека. Климат региона умеренный, однако, загрязнение воздуха, почвы и воды, вызванное промышленными выбросами, транспортной нагрузкой и высокой плотностью населения, негативно влияет на способность растений синтезировать антиоксиданты. Почвы в этом регионе могут быть загрязнены тяжелыми металлами и другими токсичными веществами, что угнетает метаболизм растений и снижает их антиоксидантный потенциал. Дополнительным фактором может выступать эффект избыточного увлажнения почвы, который снижает активность ферментных систем, участвующих в синтезе антиоксидантов. В сочетании с другими факторами это может объяснять низкие показатели АОА сырья, заготовленного в Московской области [75].

Для оценки вклада содержания аскорбиновой кислоты в полученные значения АОА, являющейся суммой активностей различных групп БАВ восстановительного характера, присутствующих в одном извлечении, было установлено содержание аскорбиновой кислоты (Таблица 70) в цветках каштана конского различных регионов произрастания (Глава 5, п. 5.5.2.3). При проведении корреляционного анализа между содержанием аскорбиновой кислоты и уровнем суммарной АОА была выявлена слабая зависимость ($r = 0,63$).

Исходя из полученных данных, следует, что антиокислительный эффект извлечений обусловлен не только аскорбиновой кислотой, но и другими группами БАВ, такими как флавоноиды, каротиноиды, сахара и дубильные вещества. Кроме того, различные АО обладают синергизмом. Например, аскорбиновая кислота может восстанавливать окисленные формы других АО, таких как витамин Е или флавоноиды, что повышает общую АОА.

Принимая во внимание широкую распространенность титриметрических методов фармакопейного анализа, было проведено определение первичной АОА настоев из цветков каштана конского различных регионов произрастания

(Таблица 70) в пересчете на кверцетин, методом перманганатометрического титрования [53, 84, 114, 134].

Выявлено, что наибольшее значение данного показателя было характерно для настоя цветков каштана, произраставших в Петрозаводском городском округе (15,8 мг/мл) и Волгоградской области (15,02 мг/мл) [53]. Результаты статистической обработки экспериментальных данных отражены в Таблице 71.

Таблица 70 – АОА цветков каштана конского различных регионов произрастания в пересчете на кверцетин

Регион произрастания	АОА настоя, мг/мл
Петрозаводский городской округ	15,80±0,22
Ленинградская область	12,99±0,18
Московская область	13,00±0,18
Воронежская область	13,07±0,19
Волгоградская область	15,02±0,21
Ставропольский край	12,98±0,18

Таблица 71 – Метрологическая характеристика результатов количественного определения АОА в пересчете кверцетин в настое из цветков каштана конского заготовленных на территории Воронежской области (P = 95 %; n = 6)

$X_{ср}$	S^2	S	$S_{хср}$	ΔX	$\Delta X_{ср}$	ε, %	$\varepsilon_{ср}$, %
13,0731	0,031032	0,17616	0,07192	0,45273	0,18483	3,46	1,41

В качестве альтернативы перманганатометрической методики определения первичной АОА, нами был разработан титриметрический способ определения АОА водных извлечений из ЛРС и ЛРП, а также суммарного содержания в них БАВ-АО в пересчете на кислоту аскорбиновую и/или галловую (в зависимости от преобладающей или целевой группы БАВ для исследуемого объекта) методом обратной цериметрии (Патент РФ № 2862904 от 26.05.2026) [120].

Для разработки методики был выбран метод цериметрии в его обратном варианте ввиду широкой применимости церия сульфата (IV) для количественного определения различных АО (в т.ч. аскорбиновой кислоты, фенольных соединений и др.). Обратное титрование позволило объективизировать процесс установления

конечной точки титрования, так как наблюдался контрастный переход окраски от сине-фиолетовой (комплекс йода с крахмалом) до цвета исходного извлечения.

На первом этапе работы была проведена оценка линейности зависимости объемов 0,1 М раствора натрия тиосульфата, пошедшего на титрование серии растворов СО кислот аскорбиновой и галловой различных концентраций.Данные вещества были выбраны в качестве СО для последующего пересчета в виду их присутствия в цветках, их известных антиокислительных свойств, возможности экстрагирования в водные извлечения, а также принадлежности к разным группам БАВ растительного происхождения (витамины и дубильные вещества гидролизуемой группы).

На Рисунке 76 и Рисунке 77 показаны графики зависимости объема 0,1 М титрованного раствора натрия тиосульфата, пошедшего на титрование, от содержания кислот аскорбиновой и галловой в аликвоте анализируемого раствора СО.

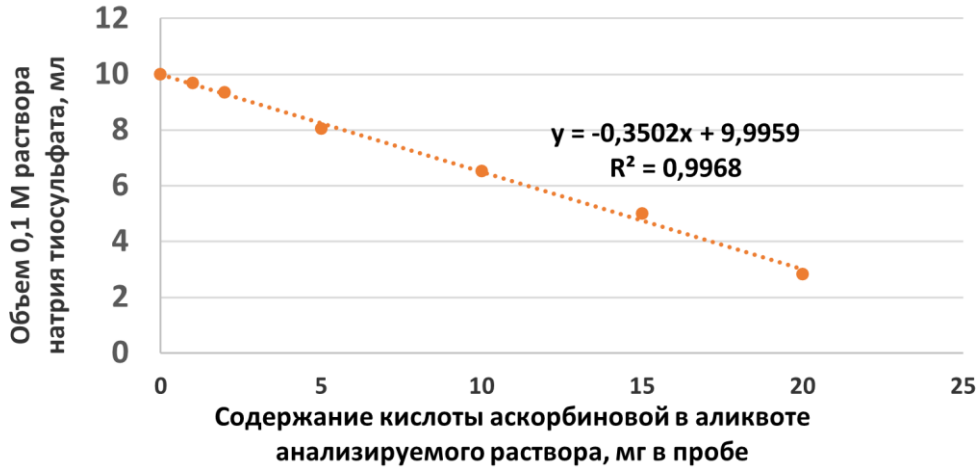


Рисунок 76 – График зависимости объема 0,1 М титрованного раствора натрия тиосульфата, пошедшего на титрование, от содержания кислоты аскорбиновой в аликвоте анализируемого раствора

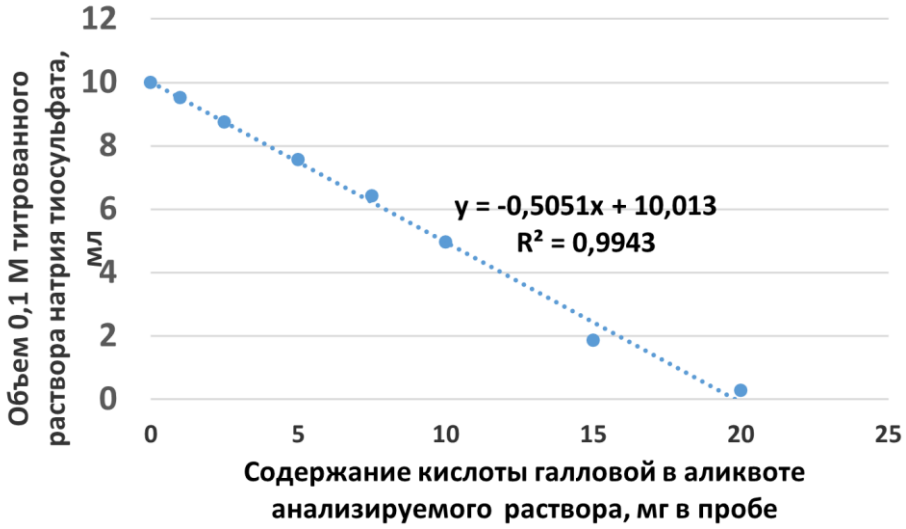


Рисунок 77 – График зависимости объема 0,1 М титрованного раствора натрия тиосульфата, пошедшего на титрование, от содержания кислоты галловой в аликвоте анализируемого раствора

Методика: точную навеску (около 5,0 г) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, заливают водой очищенной в массо-объемном соотношении с сырьем 1:10 с учетом коэффициента водопоглощения последнего и кипятят на водяной бане с обратным холодильником при периодическом перемешивании в течение 15 минут с последующим настаиванием при комнатной температуре в течение 45 минут [120].

Извлечение процеживают через несколько слоев марли в коническую колбу так, чтобы частицы сырья не попали в колбу. Аликвоту извлечения объемом 5-10 мл помещают в коническую колбу для титрования с притертой пробкой объемом 200 мл, добавляют 10 мл воды очищенной, 10 мл кислоты серной разведенной, избыточное количество (10 мл) стандартного титрованного 0,1 М раствора окислителя - сульфата церия (IV), оставляют в темном месте в закрытом виде на 30 минут для протекания реакции, а затем добавляют 1,0 г калия йодида, 40 мл воды очищенной, 1,0 мл 1 % раствора крахмала и титруют при энергичном перемешивании 0,1 М раствором натрия тиосульфата до перехода сине-фиолетовой окраски в цвет исходного извлечения, устойчивого в течение 60 секунд [164]. Вычисляют АОА извлечения в пересчете на кислоту аскорбиновую

и/или галловую в мг/мл извлечения по формулам (10) и/или (11) соответственно, а затем суммарное содержание БАВ-АО, обладающих АОА (в пересчете на кислоту аскорбиновую и/или галловую и абсолютно сухое сырье) в мг% по приведенной формуле (12).

$$AOA, мг/мл = \frac{9{,}9959 - V_T}{0{,}3502 \cdot V_a}\ , \qquad (10)$$

$$AOA, мг/мл = \frac{10{,}013 - V_T}{0{,}5051 \cdot V_a}\ , \qquad (11)$$

где V_T – объем 0,1 М титрованного раствора натрия тиосульфата, пошедший на титрование, мл; V_a – объем аликвоты извлечения, взятый на анализ, мл;

$$\sum AO, мг\% = \frac{AOA \cdot 100 \cdot 100 \cdot P}{a \cdot (100 - B)}\ , \qquad (12)$$

где АОА – вычисленная ранее по формуле 10 или 11, мг/мл; а – точная навеска сырья, г; Р – общий объем приготовленного извлечения, мл; В – потеря в массе при высушивании исследуемого сырья, %.

Разработанная методика была апробирована на образцах изучаемого ЛРС (Таблица 72) [120]. Метрологическая оценка результатов определения АОА извлечений из ЛРС (Р = 95 %; n = 6) в пересчете на аскорбиновую кислоту и галловую кислоту на примере цветков, заготовленных на территории Воронежской области, представлены в Таблице 73.

Таблица 72 – Результаты определения АОА извлечений из цветков каштана конского, а также содержания суммы БАВ, обладающих АОА (в пересчете на кислоту аскорбиновую и галловую и абсолютно сухое сырье)

№ п/п	Исследуемое ЛРС	АОА в пересчете на кислоту аскорбиновую, мг/мл извлечения из ЛРС	∑ АО в пересчете на кислоту аскорбиновую, мг% в сырье	АОА в пересчете на кислоту галловую, мг/мл извлечения из ЛРС	∑ АО в пересчете на кислоту галловую, мг% в сырье
	1	2	3	4	5
1	Воронежская область	4,05±0,12	4518,88±131,95	2,82±0,09	3140,61±91,71

Продолжение таблицы 72

2	1	2	3	4	5
	Московская область	3,70±0,11	4184,27±122,18	2,57±0,08	2906,37±84,87
3	Ленинградская область	4,45±0,13	5015,09±146,44	3,09±0,09	3480,62±101,63
4	Ставропольский край	4,31±0,13	4775,12±139,43	2,99±0,09	3312,67±96,73
5	Волгоградская область	4,10±0,12	4669,70±136,36	2,85±0,08	3246,01±94,78
6	Петрозаводский городской округ	4,52±0,11	5020,09±142,12	3,11±0,08	3492,63±99,18

Таблица 73 – Метрологическая характеристика методики определения АОА (мг/мл) в пересчете на аскорбиновую кислоту извлечений из цветков каштана конского обыкновенного (на примере сырья, заготовленного в Воронежской области)

$x_{ср}$	S^2	S	$Sx_{ср}$	Δx	$\Delta x_{ср}$	ε, %	$\varepsilon_{ср}$, %
4,05	0,01400	0,118322	0,04829	0,3041	0,12412	7,51	3,06

В сырье каштана конского обыкновенного суммарное содержание БАВ-АО варьировало в зависимости от региона произрастания, показывая максимальное накопление в сырье растений, произрастающих в условиях как самых северных, так и самых южных широт (Ленинградская область и Ставропольский край) анализируемого ареала Европейской части РФ, что также было сопоставимо с ранее полученными нами значениями определения АОА по другим методикам [75].

На заключительном этапе проведена валидация предлагаемой методики на примере сырья каштана конского (область заготовки - Воронежская). Были установлены предел количественного определения, линейность, аналитическая область методики, специфичность, прецизионность на уровне повторяемости и правильность. Принятое опорное значение 4,05 мг/мл (в пересчете на аскорбиновую кислоту) и 2,82 мг/мл (в пересчете на галловую кислоту). Специфичность методики оценивали путем титрования холостого опыта (без добавления аликвоты извлечения из ЛРС) по объему титрованного 0,1 М раствора

натрия тиосульфата (10 мл), пошедшего на титрование 10 мл титрованного 0,1 М раствора церия сульфата с К=1,00. Правильность оценивали методом «введено-найдено» путем добавки к испытуемому извлечению различных аликвот раствора СО кислот аскорбиновой и галловой. Характеристики линейности методики и другие валидационные показатели приведены в Таблице 74 и обозначены выше на Рисунке 76 – 77 данного раздела.

Прецизионность методики на уровне сходимости (внутрилабораторной) определяли в условиях, при которых шесть независимых результатов измерений (n) получали одним и тем же методом в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95% и свидетельствуют о прецизионности методики в условиях повторяемости [120].

В связи с отсутствием унифицированного подхода к оценке АОА растительных объектов, важное значение приобретает сравнительный анализ методов, используемых для этих целей. В связи с этим была проведена сравнительная оценка методов определения АОА в настое цветков каштана конского с целью выявления корреляции между показателями, полученными с помощью различных методик оценки АОА. Обобщенные результаты определения АОА в настое цветков каштана конского различными методами представлены в Таблице 75.

Таким образом, установлено что настой цветков каштана конского демонстрирует умеренную АОА, преимущественно обусловленную полифенольным комплексом сырья. Относительно низкое содержание антиоксидантов в пересчёте на аскорбиновую кислоту (0,012%) может объясняться низким содержанием самой аскорбиновой кислоты в сырье и преобладании полифенолов в составе БАВ цветков каштана, что согласуется с ранее проведенными фитохимическими исследованиями цветков каштана конского.

Таблица 74 – Валидационные характеристики методики определения АОА извлечений из каштана конского цветков (область заготовки Воронежская)

Валидационный показатель	Характеристика показателя			Результаты в пересчете на	
				аскорбиновую кислоту	галловую кислоту
Линейность	Уравнение прямой			y= -0,3502x +9,9959	y= -0,5051x +10,013
	Наклон (a)			0,3502	0,05051
	Отрезок на оси ординат b			9,9959	10,013
	Коэффициент корреляции			0,9968	0,9943
	Диапазон линейности (мг БАВ-АО в аликвоте)			0-20	
Аналитическая область методики, мг/мл	80-120% от номинального значения определяемой величины			3,7212-4,3837	2,5868-3,0461
Предел количественного определения	Количество мг БАВ-АО в аликвоте, которое можно определить количественно			2,8311	0,2696
Повторяемость (сходимость)	Проба	Объем титранта, мл		АОА, мг/мл	
	1	2,80		4,11	2,86
	2	2,90		4,05	2,82
	3	3,00		3,99	2,78
	4	2,85		4,08	2,84
	5	2,95		4,02	2,80
	6	2,90		4,05	2,82
	Наименьшее значение, мг/мл			Наибольшее значение, мг/мл	
	3,99 (в пересчете на аскорбиновую кислоту) 2,78 (в пересчете на галловую кислоту)			4,11 (в пересчете на аскорбиновую кислоту) 2,86 (в пересчете на галловую кислоту)	
	Среднее значение, мг/мл 4,05 (в пересчете на аскорбиновую кислоту) 2,82 (в пересчете на галловую кислоту)				
	Доверительный интервал (P=95%), мг/мл 4,05±0,12 (в пересчете на аскорбиновую кислоту) 2,82±0,09 (в пересчете на галловую кислоту)				
	Стандартное отклонение, % = 1,18				
	Коэффициент вариации, % = 2,92				

1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Правильность (в пересчете на аскорбиновую кислоту)	Было, мг	Введено, мг	Должно быть, мг	Найдено, мг	Процент восстановления, %
	4,0500	1,0000	5,0500	5,0032	99,07
				4,9700	98,42
				5,1210	101,39
		2,0000	6,0500	6,2340	103,04
				5,8763	97,13
				5,9040	97,59

Продолжение таблицы 74

1	2	3	4	5	6
		5,0000	9,0500	8,4567	93,44
				8,9060	98,41
				9,0005	99,45
					$R_{ср}$ = 98,66

Таблица 75 – АОА и суммарное содержание БАВ-АО в настое цветков каштана конского

Показатель	Настой (1 : 10)	Метод
АОА настоя в пересчете на аскорбиновую кислоту, мг/мл	0,02 ± 0,002	СФМ
Сумма АО в пересчете на аскорбиновую кислоту в ЛРС, %	0,01 ± 0,001	
АОА настоя в пересчете на кверцетин, мг/мл	13,07± 0,19	Перманганатометрия
АОА настоя в пересчете на аскорбиновую кислоту, мг/мл	4,05±0,12	Цериметрия
Сумма АО в пересчете на аскорбиновую кислоту в ЛРС, %	4,52±0,13	
АОА настоя в пересчете на галловую кислоту, мг/мл	2,82±0,09	
Сумма АО в пересчете на галловую кислоту в ЛРС, %	3,14±0,10	

Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования цветков каштана конского как источника природных антиоксидантов фенольной природы.

Совокупность полученных данных об АОА цветков каштана конского позволяет обосновать перспективность дальнейшего изучения данного вида сырья и разработки на его основе жидких водных и спиртосодержащих ЛФ.

6.3. Изучение биостимулирующего и/или биоцидного и мембранопротекторного действия настоя цветков каштана конского *in vitro* с использованием тест-системы инфузорий *Paramecium caudatum* в тестах «Острая токсичность» и «Функциональная нагрузка»

Методика, изложенная в Главе 2 (п. 2.11), была использована для оценки биостимулирующего и/или биоцидного и мембранопротекторного действия

настоя цветков каштана конского с применением тестов «Острая токсичность» и «Функциональная нагрузка».

Тест «Острая токсичность» применён для оценки суммарного токсического действия биологически активных и сопутствующих веществ, содержащихся в исследуемом извлечении, на жизнеспособность тест-системы, что позволяет установить наличие и степень выраженности интегрального неблагоприятного эффекта пробы [64, 65].

В тестах «Острая токсичность» и «Функциональная нагрузка» исходным уровнем (0 часов) следует считать начальную численность инфузорий *Paramecium caudatum*, внесённую в каждую пробу (контрольную и опытные) непосредственно перед началом инкубации.

Установлено, что настой цветков каштана конского в исследованных разведениях не оказывал биоцидного действия на *Paramecium caudatum*, а, напротив, способствовал более высокой сохранности популяции инфузорий по сравнению с интактным контролем в течение 24-часовой инкубации (Таблица 76, Рисунок 78).

Так, в контрольной пробе через 1 ч и 2 ч наблюдалось незначительное увеличение на 7,4% с последующим незначительным снижением на 3,5% количества инфузорий, и затем снижение численности инфузорий через 24 ч инкубации на -29,2% ($p<0,001$) относительно исходного количества, что закономерно связано с уменьшением количества питательных веществ в среде, тогда как в присутствии настоя во всех изучаемых разведениях уменьшение численности инфузорий к 24 ч инкубации являлось менее выраженным.

В разведении настоя цветков каштана конского 1:10 регистрировался прирост числа инфузорий по сравнению с контролем. Через 1 ч их количество являлось большим на 30,3% ($p<0,001$), что может свидетельствовать о биостимулирующем эффекте. Затем через 2 ч отмечалось умеренное относительное снижение на 11,6% ($p<0,05$), однако через 24 ч численность достоверно превышала контроль на 23,8% ($p<0,001$). Важно, что уменьшение числа инфузорий через 24 ч инкубации относительно исходного уровня в данной

опытной пробе (на 24,7%, p<0,01) являлось сопоставимым с аналогичной динамикой в контрольной пробе, что позволяет говорить об отсутствии прямого биоцидного действия. Полученные результаты не противоречат приведенным выше данным прогноза *in silico*, в частности предполагаемому цитотоксическому действию β-эсцина, который, как известно, практически не переходит в водные извлечения.

Таблица 76 – Изучение влияния настоя цветков каштана конского на выживаемость *Paramecium caudatum* в тесте «Острая токсичность»

Проба	Количество инфузорий в пробе, шт./время инкубации			
	Исходно (0 ч)	1 ч	2 ч	24 ч
Контрольная проба	34,00±2,042	36,53±1,942	32,80±1,384	24,07±1,165+++
Разница с исходным, %	-	7,4	-3,5	-29,2
Опытная проба 1:10	39,60±2,015*	47,60±1,536***,++	29,00±1,378*,++	29,80±0,735***,++
Разница с контролем, %	+16,5	+30,3	-11,6	+23,8
Разница с исходным, %	-	+20,2	-26,8	-24,7
Опытная проба 1:100	31,80±1,463	38,80±1,828+	26,00±1,732++**	27,20±1,356+
Разница с контролем, %	-6,5	+6,2	-20,7	+13,0*
Разница с исходным, %	-	+22,0	-18,2	-14,5
Опытная проба 1:1000	30,20±1,908	32,00±1,414*	34,60±1,860	26,40±0,927
Разница с контролем, %	-11,2	-12,4	+5,5	+9,7
Разница с исходным, %	-	+6,0	14,6	-12,6

Примечание: + – P<0,05; ++ – P<0,01, +++ – P<0,001 – достоверность различий при сравнении с исходным по группе показателем; * – P<0,05; ** – P<0,01, *** – P<0,001 – достоверность различий при сравнении между опытными и контрольными показателям

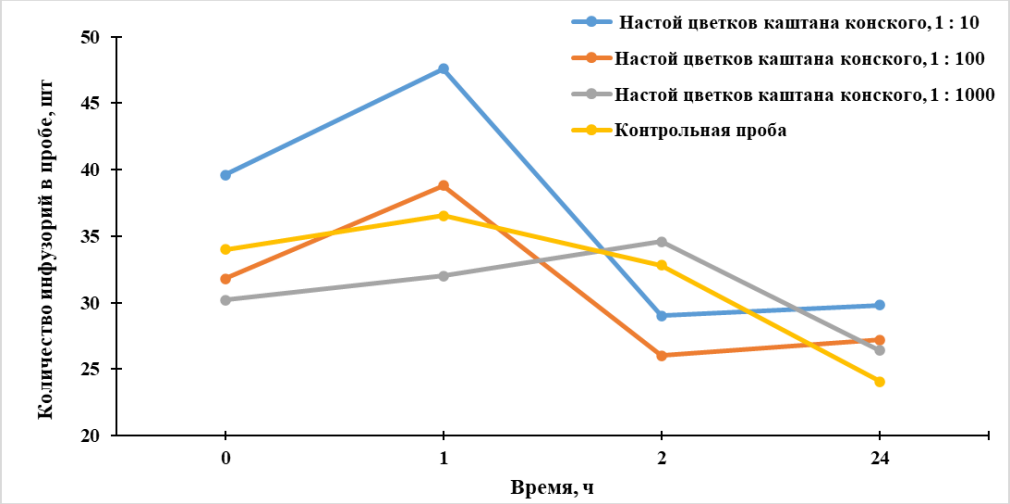


Рисунок 78 – Оценка биостимулирующего и/или биоцидного действия настоя цветков каштана конского *in vitro* в тесте «Острая токсичность»

Аналогичная, но менее выраженная тенденция наблюдалась при разведениях 1:100 и 1:1000. К концу эксперимента через 24 ч численность инфузорий в опытных пробах являлась большей при сравнении с показателями контрольной пробы на 13,0% ($p<0,05$) и 9,1% соответственно при умеренном уменьшении по отношению к исходному количеству в пробе на 14,5%, ($p<0,05$) и 12,6% соответственно, что являлось менее выраженной отрицательной динамикой количества при сравнении с контрольной пробой. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии прямого биоцидного действия настоя цветков каштана конского во всех изученных разведениях.

«Тест «Функциональная нагрузка» применен для выявления влияния БАВ, содержащихся в настое цветков, на выживаемость тест-системы при повреждающем воздействии гипертонического раствора натрия хлорида, что позволяет провести первичную оценку наличия мембранопротекторного действия (Рисунок 79)» [64, 65, 134], (Приложение 11, Таблица 1 – 4).

В контрольной пробе при добавлении определенного опытным путем расчетного количества 10% раствора натрия хлорида – 48 мкл, выявлено значительное постепенное снижение количества инфузорий: через 1 мин. на 35,2%, через 2 мин. на 63,3%, через 3 мин. на 93,5%, а к 4-й минуте – на 98,0% относительно исходного количества, что отражает выраженное ожидаемое

модельное повреждающее воздействие гипертонического раствора натрия хлорида.

При исследовании активности настоя цветков каштана в наиболее концентрированном разведении 1:10 выявлен наиболее выраженный эффект, проявляющийся как повышение количества выживших инфузорий в условиях повреждающего воздействия гипертонического раствора натрия хлорида во всех контрольных точках наблюдения. Сразу после добавления (0 мин.) 10% раствора натрия количество инфузорий в опытных пробах превышало контроль на 16,5%, через 1 мин. – на 36,2% ($P<0,001$), через 2 мин. – на 28,3%, через 3 мин. – в 2,82 раза и к 4-й мин. на 19,4%. Настой после 1 ч инкубации (разведение 1:10) обеспечивал увеличение численности инфузорий на 30,3% сразу после добавления в пробу; на 3-й и 4-й минутах регистрировались максимальные подъёмы – в 3,95 (достоверно, $P<0,01$) и 4,50 раза относительно контроля соответственно. При увеличении продолжительности инкубации до 2 ч способность настоя повышать выживаемость инфузорий оставалась выраженной: на 3-й и 4-й минутах теста показатель в 2,80 раза превышал контрольный уровень. После инкубации 24 ч настой в разведении 1:10 обеспечивал повышение количества выживших инфузорий на 23,8% сразу после добавления в пробу (0 мин., достоверно, $P<0,001$), эффект сохранялся и усиливался на 1, 2, 3 мин. (на 17,5%, 43,8%, в 3,19 раза) и достигал максимальной степени выраженности к 4-й мин., являясь в 10,0 раз большим по сравнению с контрольной пробой, что позволяет предположить наличие мембранопротекторной активности. Полученный результат согласуется с результатами прогноза фармакологической активности, а именно вышеуказанной способностью рутина, способного экстрагироваться водой, являться ингибитором проницаемости и агонистом целостности мембран. Однако, механизмы выявленной мембранопротекторной активности требуют дальнейшего изучения.

Для настоя в разведении 1:100 при внесении в пробу без инкубации (0 ч инкубации) выявлена тенденция к повышению количества выживших инфузорий максимально на 45,5% через 3 мин., однако изменения не являлись достоверными.

После инкубации 1 ч сохранялась тенденция к повышению количества выживших инфузорий на 3 и 4 мин. теста, однако различия с контрольной пробой не являлись статистически значимыми. При инкубации 2 ч выявлено повышение количества выживших инфузорий на 35,3% (P<0,05) на 2 мин. теста. Инкубация 24 ч обеспечила повышение количества живых инфузорий сразу после добавления в пробу (0 мин.) на 13,0%, на 36,2% через 2 мин., и затем на 3 и 4 мин. их количество значительно превосходило контрольную пробу в 2,48 раз (достоверно, P<0,05) и 8,00 раз соответственно, что свидетельствует о необходимости временной экспозиции для обеспечения механизмов развития указанного эффекта.

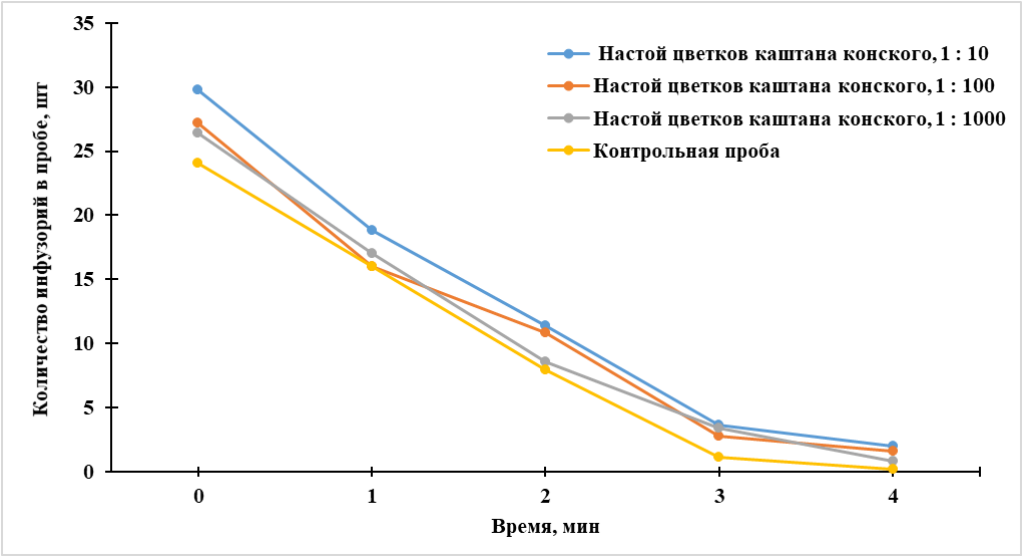


Рисунок 79 – Оценка мембранопротекторного действия настоя цветков каштана конского *in vitro* в тесте «функциональная нагрузка», инкубация 24 ч

Для настоя в разведении 1:1000 при внесении в пробу без инкубации выявлена тенденция к повышению количества выживших инфузорий на 54,5% (через 3 мин.), однако для большинства контрольных точек при инкубации 1 ч и 2 ч признаков повышения устойчивости инфузорий к повреждающему воздействию гипертонического раствора натрия хлорида не отмечено, что закономерно связано с наименьшим содержанием активных БАС при данном разведении. Однако, инкубация 24 ч обеспечила умеренное повышение выживаемости инфузорий,

наиболее выраженное на 3-й и 4-й мин. теста – в 3,01 (достоверно, $P<0,05$) и 4,00 раза больше по сравнению с контрольной пробой соответственно.

6.4. Оценка антимикробной и фунгицидной активности жидкого экстракта на основе цветков каштана конского

Выявленная на этапе скрининга *in silico* (п. 6.1. данной главы) высокая потенциальная противогрибковая и противовоспалительная активность основных групп БАВ цветков каштана конского (флавоноидов и сапонинов) в сочетании с отсутствием биоцидного действия настоя *in vitro* во всех исследованных разведениях (п. 6.3. данной главы) обусловили целесообразность проведения оценки антимикробной и противогрибковой активности (Глава 2, п. 2.11) перспективной спиртосодержащей ЛФ на основе цветков каштана конского – жидкого экстракта (1 : 1).

В качестве экстрагента при изготовлении жидкого экстракта использовали 70% спирт этиловый, как описано в Главе 2 (Глава 2, п. 2.12). Для более точной оценки антибактериальной активности изучаемого объекта проводили контроль растворителя. Этиловый спирт 70% использовался для оценки собственной антимикробной и фунгицидной активности растворителя и исключения его вклада в действие растительного экстракта. Определение антимикробной и противогрибковой активности проводили в отношении пяти клинически значимых штаммов микроорганизмов [134]. Результаты приведены в Таблице 77 – 78.

В ходе исследования оценивали способность жидкого экстракта цветков каштана конского и 70% этилового спирта (контроль растворителя) подавлять рост тест-культур микроорганизмов в диапазоне разведений от 1:2 до 1:512. Сравнительный анализ проводили по минимальной подавляющей концентрации (МПК), принимая во внимание, в каком наибольшем разведении полностью подавлялся видимый рост микроорганизмов.

Таблица 77 – Результаты определения антимикробной и фунгицидной активности жидкого экстракта цветков каштана конского

Микроорганизм	Порядковый номер разведения [11]											
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	ОС	ОП	ПК
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
E. coli	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Candida albicans	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
Bacillus cereus	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Staphylococcus aureus	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+

Примечание: «-» – роста нет; «+» – рост; «ОС» –отрицательный контроль среды Мюллера-Хинтон; «ОП» - отрицательный контроль препарата; «ПК» - положительный контроль

Таблица 78 – Результаты определения антимикробной и фунгицидной активности спирта этилового 70% (экстрагент)

Микроорганизм	Порядковый номер разведения [11]											
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	ОС	ОП	ПК
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
E. coli	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Candida albicans	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
Bacillus cereus	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Staphylococcus aureus	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+

Примечание: «-» – роста нет; «+» – рост; «ОС» –отрицательный контроль среды Мюллера-Хинтон; «ОП» - отрицательный контроль препарата; «ПК» - положительный контроль

Экстракт расценивали как более активный по сравнению с контрольным растворителем, если подавление роста сохранялось в более высоких разведениях (то есть при меньшей концентрации) по отношению к 70% этанолу; как сопоставимый с контролем – при одинаковых значениях МПК; как менее активный – при подавлении роста лишь в более концентрированных разведениях по сравнению с эталонным растворителем.

Спиртовой экстракт цветков каштана конского не продемонстрировал антимикробной и противогрибковой активности в отношении исследуемых видов тест-микроорганизмов. В отношении дрожжеподобных грибков *Candida albicans* и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* активность экстракта каштана была сопоставима с действием 70% этанола: подавление роста регистрировалось до разведения 1:8 включительно, что позволяет предположить преобладающий вклад антисептических свойств спиртовой основы в наблюдаемый эффект.

Наиболее низкая антимикробная активность экстракта каштана конского выявлена в отношении грамположительных бактерий *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus*. Для обеих культур подавление роста фиксировалось только в наиболее концентрированном разведении 1:2, тогда как 70% этанол сохранял активность против *S. aureus* и *B. cereus* до разведения 1:8. Кроме того, экстракт цветков каштана конского уступал растворителю по антимикробной активности против грамотрицательной палочки *Pseudomonas aeruginosa*. Подавление роста экстрактом наблюдалось лишь до разведения 1:8, тогда как растворитель сохранял активность в разведении 1:16 [76]. Обобщенные данные о МПК исследуемых объектов представлены в Таблице 79.

Таблица 79 – Минимальные подавляющие разведения исследуемых препаратов

Тест-культура	Жидкий экстракт	70% этанол
Pseudomonas aeruginosa	1:8 (↓)	1:16
Escherichia coli	1:8 (=)	1:8
Candida albicans	1:16 (=)	1:16
Bacillus cereus	1:2 (↓)	1:8
Staphylococcus aureus	1:2 (↓)	1:8

Примечание: соотношение активности с контролем (70% этанолом), (↓) – уступает контролю; (=) – сопоставим с контролем

Полученные результаты не противоречат прогнозируемому *in silico* химиопрофилактическому эффекту γ-ситостерола и эргостерина, противовирусному, противогрибковому эффектам β-эсцина, так как прогноз не показал предполагаемого прямого антибактериального действия. Более того, результаты отсутствия антибактериальной активности согласуются с выявленным

в эксперименте отсутствием биоцидного действия и мембранопротекторной активностью настоя цветков каштана конского.

Дальнейшие фитохимические и фармакологические исследования, направленные на идентификацию конкретных молекул, ответственных за наблюдаемые эффекты, представляются перспективным направлением последующих работ.

6.5. Выбор оптимальных лекарственных форм на основе цветков каштана конского и их стандартизация

ЖЛФ на основе ЛРС характеризуются целым рядом преимуществ, обусловливающих их высокую востребованность, как в фармацевтической практике, так и среди потребителей. К основным достоинствам жидких форм относятся простота получения с использованием стандартных технологических методов, например, таких как настаивание, мацерация или перколяция, легкий способ дозирования и введения в организм, а также их ценовая доступность [84, 134, 140]. В связи с этим, одним из актуальных направлений фармации является разработка новых отечественных ЛРП в виде настоев, настоек и жидких экстрактов на основе цветков данного растения с потенциальным венотонизирующим, капилляропротекторным и антиоксидантным действием.

Поскольку флавоноиды и сапонины были выбраны в качестве целевых групп БАВ сырья, в соответствии с принципами сквозной стандартизации, для изучаемых лабораторных образцов ЖЛФ были разработаны методики их количественного определения. [51, 82, 134]. Методы количественной оценки суммы флавоноидов и сапонинов в опытных образцах ЛФ, согласно принципам сквозной стандартизации, базировались на ранее разработанных и валидированных методиках количественного определения суммы флавоноидов и сапонинов в цветках каштана конского [51].

Методики определения флавоноидов в ЛФ в пересчете на рутин (Таблица 80). Для определения суммы флавоноидов в мерную колбу вместимостью Vk_1 мл помещали а мл испытуемой ЖЛФ, объем раствора доводили до метки 95% спиртом этиловым и перемешивали (раствор А). Отбирали a_1 мл раствора А в

мерную колбу вместимостью Vk_2 мл и добавляли 2,0 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% спирте этиловом, объем раствора доводили до метки 95% спиртом этиловым и перемешивали (раствор Б). Оптическую плотность полученного раствора Б (раствора А в случае определения в настое) измеряли на спектрофотометре через 50 минут после добавления алюминия хлорида в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 407±2 нм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, содержащий такой же объем аликвоты ЖЛФ или ее разведения a_1 (раствора А), доведенного 95% спиртом этиловым до метки в мерной колбе вместимостью Vk_2 мл.

Таблица 80 – Условия определения суммы флавоноидов в экспериментальных образцах ЖЛФ

Аликвота ЖЛФ (а, мл)	Vk_1, мл (раствор А)	Аликвота разведения (a_1, мл)	Vk_2, мл (раствор Б)	Расчётная формула
Настой				
1	25	-	-	$X,\% = \frac{A \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100}$ (13)
Настойка (метод мацерации)				
2,5	25	2,5	25	$X,\% = \frac{A \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 1000}$ (14)
Настойка (метод дробной мацерации)				
1	50	-	-	$X,\% = \frac{A \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 50}$ (15)
Настойка (метод перколяции)				
2,5	25	2,5	50	$X,\% = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 20}{A_0 \cdot a}$ (16)
Жидкий экстракт				
2,5	25	1,0	50	$X,\% = \frac{A \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 2}$ (17)

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора СО рутина.

Приготовление раствора СО рутина и раствора сравнения проводили в соответствии с методикой, описанной в Главе 5, п. 5.3.1.1.

Вид дифференциальных спектров поглощения комплексов алюминия с флавоноидами ЖЛФ на основе цветков каштана конского представлены на

Рисунке 80. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (X) в процентах в ЖЛФ вычисляли по формулам (13-17), где А – оптическая плотность исследуемого раствора после взаимодействия с $AlCl_3$; A_o – оптическая плотность раствора СО рутина после взаимодействия с $AlCl_3$; а – аликвота ЖЛФ, взятая на анализ, мл; a_o – масса СО рутина, г; Р – содержание основного вещества в СО рутина, %.

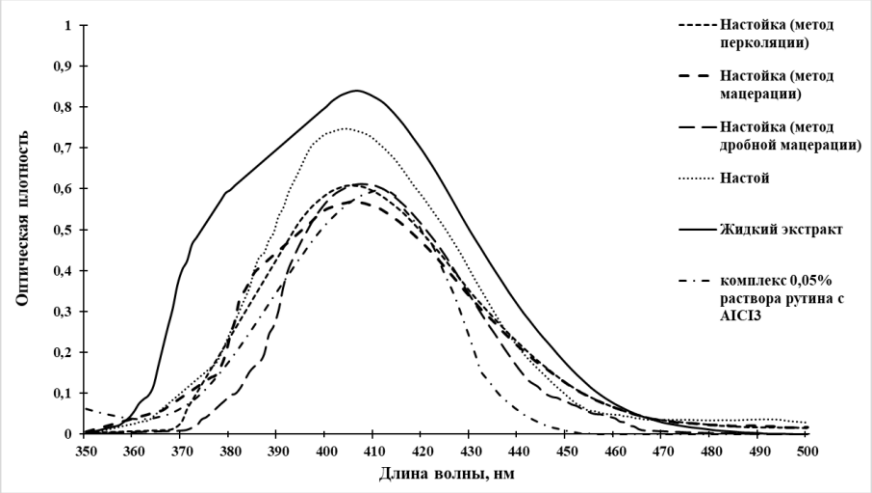


Рисунок 80 – Вид дифференциальных спектров поглощения комплексов алюминия с флавоноидами ЖЛФ на основе цветков каштана конского

Следующий шаг научной работы ознаменовался разработкой методики, предназначенной для количественного анализа суммарного содержания ТС в пересчёте на β-эсцин в изготовленных лабораторных образцах ЖЛФ из цветков каштана [11]. В соответствии с принципами сквозной стандартизации, за основу была взята ранее разработанная и валидированная методика количественной оценки суммы сапонинов в данном растительном сырье.

Для определения суммы сапонинов в мл ЛФ (Таблица 81) помещали в выпарительную чашку и упаривали на кипящей водяной бане досуха. Затем сухой остаток дважды обрабатывали хлороформом по 5 мл. Объединённый хлороформный раствор упаривали на водяной бане, при температуре не выше 80˚С, остаток высушивали и к полученному сухому остатку добавляли 5 мл кислоты серной концентрированной (Vk_1), перемешивали и термостатировали при

температуре 70˚С 30 минут, полученный раствор охлаждали (раствор А). a_1 мл раствора А доводили мерной пипеткой до общего объема в 10 мл кислотой серной концентрированной (Vk_2, раствор Б). Затем a_2 мл раствора Б доводили мерной пипеткой до общего объема в Vk_3 мл кислотой серной концентрированной (Vk_3, раствор В). Оптическую плотность полученного окрашенного раствора измеряли на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 322±3 нм. Раствором сравнения выступала кислота серная концентрированная.

Таблица 81 – Условия определения суммы сапонинов в экспериментальных образцах ЖЛФ

Аликвота ЖЛФ (а, мл)	Vk_1, мл (раствор А)	Аликвота разведения (a_1, мл)	Vk_2, мл (раствор Б)	Аликвота разведения (a_2, мл)	Vk_3, мл (раствор В)	Расчётная формула
Настой						
1	5	0,5	10	0,5	5	$X,\% = \frac{A \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100}$ (18)
Настойка (метод мацерации)						
0,5	5	0,5	10	0,5	5	$X,\% = \frac{A \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100}$ (19)
Настойка (метод дробной мацерации)						
0,5	5	0,5	10	1,0	5	$X,\% = \frac{A \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 200}$ (20)
Настойка (метод перколяции)						
0,5	5	0,5	10	0,5	5	$X,\% = \frac{A \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 100}$ (21)
Жидкий экстракт						
0,5	5	0,5	10	0,5	10	$X,\% = \frac{A \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot a \cdot 50}$ (22)

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора СО β-эсцина, приготовленного в аналогичных условиях (Глава 5, п. 5.4.2.1). Вид спектров поглощения продуктов взаимодействия кислоты серной концентрированной с сапонинами лабораторных образцов ЖЛФ на основе цветков каштана конского представлены на Рисунке 81.

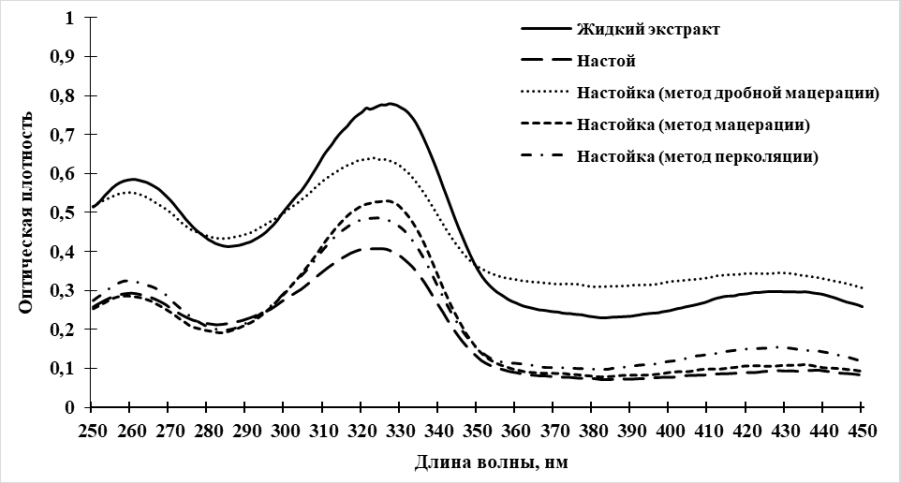


Рисунок 81 – Вид спектров поглощения продуктов взаимодействия кислоты серной концентрированной с сапонинами лабораторных образцов ЖЛФ на основе цветков каштана конского

Содержание суммы ТС в пересчете на β-эсцин (Х) в процентах в ЖЛФ вычисляли по формулам (18-22), где А – оптическая плотность испытуемого раствора В; A_0 – оптическая плотность СО (раствор Г); а – аликвота ЖЛФ, взятая на анализ, мл; a_0 – масса СО, г.

Одним из потенциальных видов фармакологической активности, в виду значительного содержания в изучаемом сырье соединений фенольной природы (флавоноидов [50] и лейкоантоцианов), может являться АОА. Оценку АОА проводили в соответствии с известной спектрофотометрической методикой [74], использованной для настоя цветков (Глава 6, п. 6.2). Однако, у используемой методики имелись ограничения по используемому растворителю. В спиртовых растворах медиаторная пара выпадала в осадок, поэтому было принято решение разбавлять спиртосодержащие ЖЛФ в соотношении 1:25 [51]. Вид спектров поглощения ЖЛФ на основе цветков каштана конского в присутствии медиаторной пары $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ представлен на Рисунке 82.

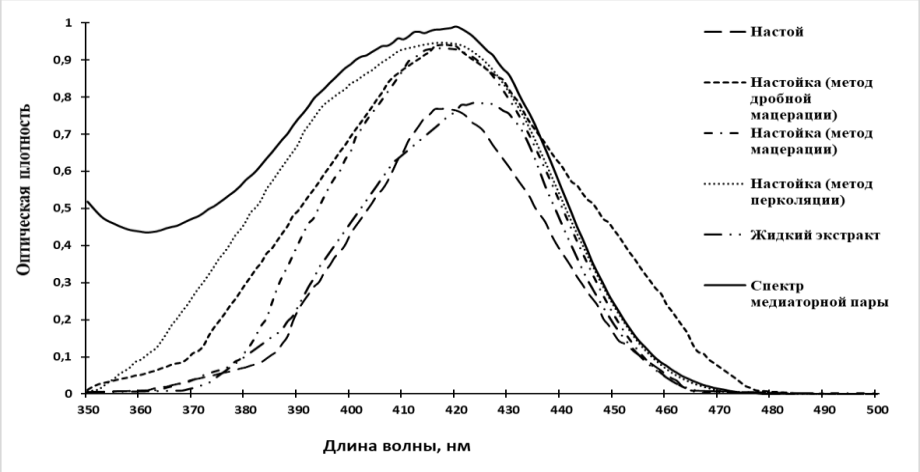


Рисунок 82 – Спектр поглощения ЖЛФ на основе цветков каштана конского в присутствии медиаторной пары $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$

Результаты определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин, суммы ТС в пересчете на β-эсцин и результаты оценки АОА лабораторных образцах водно-спиртовых ЖЛФ представлены в Таблице 82.

Таблица 82 – Результаты определения БАВ в полученных водно-спиртовых ЖЛФ на основе цветков каштана конского

БАВ/ЖЛФ	Настой	Настойка (дробная мацерация)	Настойка (мацерация)	Настойка (перколяция)	Жидкий экстракт
Сумма флавоноидов, %	0,062 ± 0,002	0,105 ± 0,003	0,335 ± 0,011	0,402 ± 0,013	**1,395 ± 0,045**
Сумма сапонинов, %	0,07 ± 0,001	0,09 ± 0,001	0,16 ± 0,002	0,14 ± 0,002	**0,46 ± 0,006**
АОА×10^{-5}, г/мл	2,352± 0,186	11,828 ± 0,684	13,408± 3,661	10,939± 0,682	**32,196± 10,244**
Сумма АО в пересчете на аскорбиновую кислоту, %	0,012 ± 0,001	0,296 ± 0,017	0,335 ± 0,092	0,274 ± 0,017	**0,805 ± 0,256**

Результаты стандартизации изучаемых ЖЛФ приведены в Таблице 83. Анализ фармакопейных показателей качества ЖЛФ на основе цветков каштана выявил более высокие значения сухого остатка и плотности у жидкого экстракта,

что также косвенно может свидетельствовать о лучшем переходе БАВ в данную ЛФ [51].

Содержание этанола в готовых спиртосодержащих ЖЛФ было выше у настоек, вне зависимости от технологии их изготовления. Согласно литературным данным: «Это может быть вызвано особенностями самой технологии в которой отсутствует стадия нагревания и упаривания финальных 15% извлечения в сравнении с методикой приготовления жидкого экстракта методом перколяции. Содержание тяжелых металлов в лабораторных образцах извлечений не превышало допустимых нормативных показателей» [26, 84, 134].

Таблица 83 – Показатели качества ЖЛФ на основе цветков каштана конского

Показатель качества	Настой	Настойка (дробная мацерация)	Настойка (мацерация)	Настойка (перколяция)	Жидкий экстракт
Описание	Жидкость светло-коричневого цвета, мутная, запах специфичный, сладковатый	Жидкость желто-коричневого цвета, прозрачная, осадок отсутствует, запах специфичный, сладковатый	Жидкость коричневого цвета, прозрачная, осадок отсутствует, запах специфичный, сладковатый	Жидкость темно-коричневого цвета, прозрачная, возможно присутствие осадка, запах специфичный, сладковатый	Жидкость насыщенного темно-коричневого цвета, непрозрачная, возможно присутствие осадка, выраженный специфичный сладковатый запах
pH	6,01	-	-	-	-
Плотность, г/мл	-	0,897	0,896	0,895	0,991
Тяжёлые металлы, %	-	≤ 0,001			≤ 0,01
Сухой остаток, %	0,135 ± 0,001	0,104 ± 0,0003	0,173 ± 0,002	0,155 ± 0,0004	0,939 ± 0,004
Содержание спирта, %	-	68,06%	66,58%	68,06%	65,08%

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что способ получения, а также используемый экстрагент, существенно влияют на извлечение БАВ в ЖЛФ. По экспериментальным результатам, настой цветков каштана конского обладает наименьшими числовыми показателями по содержанию сумм

флавоноидов и сапонинов, проявляя меньшую АОА, по сравнению с водно-спиртовыми ЖЛФ из-за ограниченной экстрагирующей способности воды.

Среди настоек, по содержанию суммы АО в пересчете на аскорбиновую кислоту лидируют настойки, полученные методом мацерации и перколяции (в пределах ошибки определения), однако, настойка, полученная методом мацерации, уступает по содержанию суммы флавоноидов настойке, полученной методом перколяции, что позволяет предположить о том, что с помощью данного метода помимо флавоноидов лучше извлекаются другие группы БАВ, также оказывающие АОА. Высокая АОА жидкого экстракта может быть связана со значительным содержанием в нем не только флавоноидов, но и других АО (лейкоантоцианов, каротиноидов и т.д.).

Минимальное количество сапонинов отмечено в настое ($0{,}07 \pm 0{,}001$ %), тогда как при переходе к настойкам, полученным методами мацерации и перколяции, содержание возрастает практически в 2 раза (до 0,14–$0{,}16 \pm 0{,}002$ %). Настойка, полученная дробной мацерацией ($0{,}09 \pm 0{,}001$ %), лишь немного превосходит водное извлечение, приготовленное по типу настоя, что указывает на ограниченную эффективность данного варианта и экстрагента по сравнению с классической мацерацией и перколяцией. Наиболее высоким содержанием сапонинов характеризуется жидкий экстракт ($0{,}46 \pm 0{,}006$ %), что значительно превосходит все остальные изучаемые ЖЛФ и позволяет отнести его к формам с максимальным выходом сапонинов [51].

В результате проведенного исследования полученных образцов ЖЛФ на основе цветков каштана конского можно заключить, что жидкий экстракт характеризуется наиболее высоким содержанием БАВ (сухой остаток, сумма флавоноидов и сапонинов, содержания БАВ восстановительного характера). Это может объясняться тем, что жидкий экстракт, получают при более длительном времени экстракции с дополнительным концентрированием второй части экстракта, что способствует более полному переходу БАВ из растительного сырья [51].

На следующем этапе работы было проведено исследование состава флавоноидов и сапонинов анализируемых лабораторных образцов ЖЛФ методом ТСХ по методикам, описанным нами ранее для ЛРС [39, 52, 111]. Условия разделения обобщены в Главе 2 (п. 2.8). Вид полученных хроматограмм приведен на Рисунках 83 – 84, параметры эффективности разделения – в Таблицах 84 – 85.

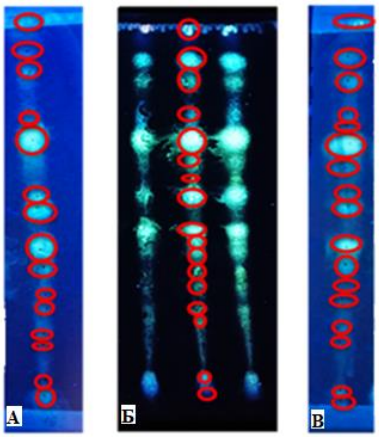


Рисунок 83 – Вид хроматограмм разделения флавоноидов ЖЛФ, полученных при нанесении: А – 10 мкл настоя; Б – 3 мкл настоек; В – 1 мкл жидкого экстракта

Хроматографический профиль всех исследованных ЖЛФ продемонстрировал качественное разделение компонентов БАВ: величина разрешения для соседних пиков превысила 1,0 (данные обобщены в Таблице 84–85). При визуализации в УФ-свете хроматограмм водного извлечения из цветков каштана с объёмом пробы 10 мкл зафиксировано 15 пятен, относящихся к флавоноидам. Три из них: рутин, кверцетин и апигенин идентифицированы по совпадению с достоверными СО. Остальные зоны также отнесены к группе флавоноидов на основании их типичной флуоресценции в ультрафиолетовом диапазоне. Вид хроматографического профиля настоек, как показало опробование методики, не определяется способом их изготовления (мацерация, дробная мацерация или перколяция). Установлен оптимальный для проведения анализа объём пробы в 3-5 мкл. На хроматограммах визуализировалось 17 зон, среди которых был идентифицирован рутин, кверцетин и апигенин. При использовании ТСХ-методики для анализа жидкого экстракта и нанесении пробы объёмом 1 мкл

на хроматограммах также фиксировалось 17 зон, в т.ч. рутин, кверцетин и апигенин, а также 14 неидентифицированных зон группы флавоноидов.

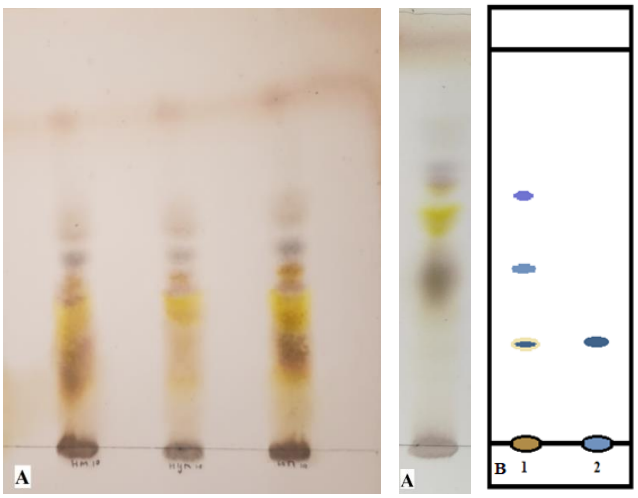


Рисунок 84 – Хроматограммы профиля сапонинов ЖЛФ из цветков каштана конского: А – 10 мкл настоек, полученных различными методами; Б – 4 мкл жидкого экстракта; В – точка 1 – 10 мкл настоя; точка 2 – 5 мкл 0,1% раствора СО β-эсцина в спирте этиловом 70%

Таблица 84 – Параметры эффективности хроматографического разделения флавоноидов исследуемых опытных образцов ЖЛФ цветков каштана конского

№ зоны	Настой (10 мкл)			Настойка (3 мкл)			Жидкий экстракт (1 мкл)		
	R_f±0,02	α*	R**	R_f±0,02	α*	R**	R_f±0,02	α*	R**
1	0,02	49,00	3,13	0,01	99,00	4,13	0,02	49,00	2,04
2	0,06	15,67		0,04	24,00		0,04	24,00	
3	0,14	6,14	2,55	0,15	5,67	4,23	0,15	5,67	4,23
4	0,17	4,88	1,26	0,20	4,00	1,42	0,19	4,26	1,33
5	0,24	3,17	1,54	0,29	2,70	1,48	0,25	3,00	1,42
6	0,27	2,70	1,17	0,30	2,33	1,16	0,28	2,57	1,17
7	0,33	2,03	1,33	0,35	1,86	1,25	0,34	2,03	1,27
8	0,38	1,63	1,25	0,37	1,70	1,09	0,39	1,56	1,30
9	0,48	1,08	1,51	0,45	1,44	1,18	0,49	1,04	1,50
10	0,51	0,96	1,13	0,55	0,82	1,76	0,53	0,89	1,17
11	-	-	-	0,60	0,66	1,24	0,59	0,69	1,29
12	0,66	0,52	1,85	0,66	0,52	1,27	0,65	0,54	1,28
13	-	-	-	0,72	0,39	1,33	0,70	0,43	1,26
14	0,75	0,33	1,58	0,75	0,33	1,18	0,73	0,34	1,26
15	0,84	0,19	1,74	0,81	0,23	1,43	0,83	0,20	1,70
16	0,90	0,11	1,73	0,90	0,14	1,64	0,90	0,11	1,82
17	0,98	0,02	5,50	0,97	0,03	4,67	0,98	0,02	5,50

*α – селективность разделения; **R – разрешение двух хроматографических зон.

ТСХ-анализ сапонинов показал, что на хроматограммах при нанесении 10 мкл настоя из цветков каштана наблюдалось наличие трех зон со значениями R_f = 0,42; 0,54; 0,63 (Таблица 85), имеющих характерную окраску после обработки пластины 25%-ным раствором фосфорновольфрамовой кислоты, одна из которых соответствует зоне адсорбции 5 мкл 0,1% раствора СО β-эсцина со значением R_f = 0,45 и характерным синим цветом пятна. Характер хроматографического профиля сапонинов при тестировании методики на настойках не зависел от способа их изготовления (мацерация, дробная мацерация или перколяция). Лучшее разделение наблюдалось при нанесении 10 мкл извлечения. На хроматограммах наблюдалось 11 зон, среди которых был идентифицирован β-эсцин. Также фиксировалось наличие нескольких неустановленных зон, относящихся к сапонинам и другим БАВ. Установлено, что при нанесении неразбавленного образца жидкого экстракта разделения зон не происходило. В связи с этим жидкий экстракт был дополнительно разведён в 5 раз. При нанесении 4 мкл разбавленного экстракта, на хроматограммах регистрировали 10 зон, включая зону β-эсцина, а также 9 неидентифицированных зон в т.ч. сапониновой природы по характерному синему, сиреневому, розовому и фиолетовому окрашиванию.

Таблица 85 – Параметры эффективности хроматографического разделения сапонинов исследуемых опытных образцов ЖЛФ цветков каштана конского

№ зоны	Настой (10 мкл)			Настойки (10 мкл)			Жидкий экстракт 1:5 (4 мкл)		
	R_f±0,02	α*	R**	R_f±0,02	α*	R**	R_f±0,02	α*	R**
1	0,42	1,38	0,62	0,16	5,25	1,4	0,29	2,45	1,38
2	0,54	0,85	0,69	0,21	3,76	1,17	0,36	1,78	1,46
3	0,63	0,59	-	0,24	3,21	1,38	0,45	1,22	1,08
4	-	-	-	0,3	2,33	1,2	0,47	1,13	1,18
5	-	-	-	0,34	1,94	1,14	0,51	0,96	1,17
6	-	-	-	0,37	1,70	1,18	0,55	0,82	1,19
7	-	-	-	0,41	1,44	1,27	0,59	0,69	1,08
8	-	-	-	0,47	1,13	1,27	0,61	0,64	1,49
9	-	-	-	0,53	0,89	1,19	0,7	0,43	1,16
10	-	-	-	0,57	0,75	3,26	0,73	0,37	-
11	-	-	-	0,81	0,23	-	-	-	-

*α – селективность разделения; **R – разрешение двух хроматографических зон.

На дальнейшем этапе работы был рассчитан материальный баланс по флавоноидам и сапонинам для полученных лабораторных образцов ЖЛФ на основе цветков каштана конского. Результаты представлены в Таблице 86.

Таблица 86 – Материальный баланс по флавоноидам/сапонинам для полученных образцов ЖЛФ

<table>
<tr><td rowspan="2">Взято ЛРС, г</td><td rowspan="2">Содержание флаваноидов/ сапонинов в ЛРС, г</td><td rowspan="2">Получено ЛФ, мл</td><td rowspan="2">Содержание флавоноидов/сапонинов в ЛФ, г</td><td colspan="2">Эффективность экстракции</td></tr>
<tr><td>флавоноидов</td><td>сапонинов</td></tr>
<tr><td colspan="6">Настой (1:10)</td></tr>
<tr><td>5,0</td><td>0,1476/0,068</td><td>50</td><td>0,0312/0,035</td><td colspan="2">Выход (степень использования ЛРС), %</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Всего</td><td rowspan="3">0,1476/0,068</td><td rowspan="3">Потери
Всего</td><td rowspan="3">0,1163/0,033
0,1476/0,068</td><td>21,15</td><td>51,47</td></tr>
<tr><td colspan="2">Остаточное содержание БАВ в ЛРС, %</td></tr>
<tr><td>78,850</td><td>48,53</td></tr>
<tr><td colspan="6">Настойка (1:5), метод дробной мацерации</td></tr>
<tr><td>20,0</td><td>0,59/0,272</td><td>100</td><td>0,1052//0,09</td><td colspan="2">Выход (степень использования ЛРС), %</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Всего</td><td rowspan="3">0,59/0,272</td><td rowspan="3">Потери
Всего</td><td rowspan="3">0,4848/0,182
0,59/0,272</td><td>17,83</td><td>33,09</td></tr>
<tr><td colspan="2">Остаточное содержание БАВ в ЛРС, %</td></tr>
<tr><td>82,14</td><td>66,91</td></tr>
<tr><td colspan="6">Настойка (1:5), метод мацерации</td></tr>
<tr><td>10,0</td><td>0,295/0,136</td><td>50</td><td>0,16735/0,08</td><td colspan="2">Выход (степень использования ЛРС), %</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Всего</td><td rowspan="3">0,295/,136</td><td rowspan="3">Потери
Всего</td><td rowspan="3">0,12763/0,056
0,29498/0,136</td><td>56,73</td><td>58,82</td></tr>
<tr><td colspan="2">Остаточное содержание БАВ в ЛРС, %</td></tr>
<tr><td>43,2</td><td>41,18</td></tr>
<tr><td colspan="6">Настойка (1:5), метод перколяции</td></tr>
<tr><td>10,0</td><td>0,295/0,136</td><td>50</td><td>0,2009/0,07</td><td colspan="2">Выход (степень использования ЛРС), %</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Всего</td><td rowspan="3">0,295/0,136</td><td rowspan="3">Потери
Всего</td><td rowspan="3">0,0941/0,066
0,295/0,136</td><td>68,10</td><td>51,47</td></tr>
<tr><td colspan="2">Остаточное содержание БАВ в ЛРС, %</td></tr>
<tr><td>31,9</td><td>48,53</td></tr>
<tr><td colspan="6">Жидкий экстракт (1:1)</td></tr>
<tr><td>50,0</td><td>1,475/0,68</td><td>50</td><td>0,69725/0,23</td><td colspan="2">Выход (степень использования ЛРС), %</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Всего</td><td rowspan="3">1,475/0,68</td><td rowspan="3">Потери
Всего</td><td rowspan="3">0,77775/0,45
1,475/0,68</td><td>47,27</td><td>33,82</td></tr>
<tr><td colspan="2">Остаточное содержание БАВ в ЛРС, %</td></tr>
<tr><td>57,73</td><td>66,18</td></tr>
</table>

Показателем материального баланса, характеризующим эффективность экстракции БАВ из цветков каштана, является выход по целевым действующим веществам – флавоноидам и сапонинам. Расчет данного показателя для исследуемых лабораторных образцов ЖЛФ в процентах проводили по формуле (23):

$$\eta = \frac{a}{b} \times 100\,, \qquad (23)$$

где a – содержание целевой группы БАВ в ЛФ; b – содержание целевой группы БАВ в растительном сырье

Исходя из рассчитанных параметров, одной из оптимальной ЖЛФ для изучаемого ЛРС с точки зрения выхода сапонинов является настойка (1:5), изготовленная методом мацерации. В сравнении с остальными изучаемыми ЛФ для нее были характерны наибольшая эффективность экстракции целевой группы БАВ (58,82%) и минимальные потери (остаток 41,18%). Настойка (1:5), полученная по методу перколяции, также показывала хорошие результаты с выходом 51,47%. Эта же водно-спиртовая ЖЛФ показала большую эффективность экстракции флавоноидов и меньшие их потери.

Жидкий экстракт (1:1) является предпочтительной ЖЛФ благодаря максимальной концентрации сапонинов флавоноидов и наибольшему абсолютному их выходу (0,23 г и 0,70 г в 50 мл соответственно). Несмотря на больший расход ЛРС, оптимизация процесса экстракции при внедрении и масштабировании в заводское производство может позволить поднять процентный выход целевых групп БАВ.

В Таблице 87 приведены режимы дозирования лабораторного образца извлечения, полученного по типу жидкого экстракта. Их обоснованием служат проведённые исследования, в ходе которых оценивалось содержание флавоноидов и сапонинов в данной ЖЛФ. Расчет проводили с учетом рекомендуемых для взрослых значений суточного потребления рутина для восполнения адекватного уровня, а также рекомендации по дозированию суммы ТС в пересчете на β-эсцин, изложенные в инструкции по медицинскому

применению ЛРП «Эскузан» [183]. Суммарный режим дозирования разработанного жидкого экстракта может составлять 2-3 мл жидкого экстракта 3 раза в день.

Таблица 87 – Рекомендации по режиму дозирования жидкого экстракта цветков каштана конского

Показатель	Содержание, мг/мл	Рекомендуемый норматив для включения в НД, мг/мл	Суточная потребность/ рекомендуемая доза [104]	Режим дозирования
Флавоноиды (в пересчете на рутин)	13,95 ± 0,45	Не менее 10	30 – 100 мг	От 5 мл жидкого экстракта (прием по 1 чайной ложке 1 раз в день)
Сапонины (в пересчете на β-эсцин)	4,60 ± 0,06	Не менее 4	10 мг 3 раза в день	2-3 мл жидкого экстракта (3 раза в день)

Таким образом, цветки каштана конского являются перспективным ЛРС, на основе которого могут быть разработаны эффективные и безопасные отечественные ЛРП. В качестве одной из перспективных ЖЛФ из цветков каштана, благодаря высокой концентрации БАВ, можно рекомендовать жидкий экстракт, как самостоятельную ЛФ для приема внутрь, а также в составе композиций наружных мягких лекарственных форм, что согласуется с современными тенденциями развития фармацевтического рынка флеботропных препаратов.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6

1. С помощью веб-ресурса PASS-online проведен прогноз фармакологической активности БАВ цветков каштана конского *in silico,* свидетельствующий о целесообразности исследований гиполипидемического, гастроэнтеропротекторного, гепатопротекторного действия, а также дальнейшего изучения перспективности применения в качестве флеботропного средства при местном применении и приеме внутрь.

2. Методом дифференциальной спектрофотометрии проведено определение АОА извлечений из цветков каштана конского, заготовленных в различных

регионах произрастания РФ и установлено суммарное содержание веществ – АО в пересчете на аскорбиновую кислоту и абсолютно сухое сырье. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования цветков каштана конского как источника природных антиоксидантов фенольной природы.

3. Разработана и валидирована методика определения АОА извлечений из цветков каштана конского и суммарного содержания в ЛРС БАВ-АО в пересчете на кислоту аскорбиновую и/или галловую методом обратной цериметрии. Наибольшей АОА характеризовалось сырье, заготовленное в условиях как самых северных, так и самых южных широт (Ленинградская область и Ставропольский край) анализируемого ареала Европейской части РФ.

4. Настой цветков каштана конского в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000 не оказывает выраженного биоцидного действия на тест-систему *Paramecium caudatum* в тесте «острая токсичность», проявляет умеренный биостимулирующий эффект, максимальный в разведении 1:10, обеспечивая повышение количества инфузорий при инкубации 1 ч на 30,3% по сравнению с контрольной пробой.

5. Настой цветков каштана конского в тесте «функциональная нагрузка» на тест-системе *Paramecium caudatum* проявляет мембранопротекторную активность, наиболее выраженную в разведении 1:10, что подтверждается значительным повышением количества выживших инфузорий не менее чем в 3 раза (на 3-й мин. теста) при инкубации 1 ч и максимально в 10 раз по сравнению с контрольной пробой при инкубации 24 ч.

6. Жидкий экстракт цветков каштана конского в разведениях от 1:2 до 1:512 не проявляет достаточной антибактериальной активности *in vitro* в отношении штаммов возбудителей *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus*, и не проявляет достаточной противогрибковой активности в отношении *Candida albicans*.

7. Изготовлены лабораторные образцы водно-спиртовых извлечений на основе цветков каштана конского, полученных по типу настоя, настойки и экстракта жидкого. Их стандартизация была проведена по нормативным

показателям, в соответствии с НД. Для оценки содержания целевых групп БАВ (флавоноидов и сапонинов) в извлечениях разработаны методики их количественного определения. Методом ТСХ установлена вариабельность состава флавоноидов и сапонинов в водно-спиртовых извлечениях. Состав флавоноидов в ЖЛФ представлен от 15 до 17 БАВ флавоноидной природы, а сапонинов - от 3 до 11 БАВ этой группы. Жидкий экстракт (1:1) продемонстрировал пиковое содержание веществ АО (флавоноидов и сапонинов) в сравнении с другими изучаемыми ЛФ. Это даёт основание рекомендовать данную форму в качестве оптимальной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное фармакогностическое исследование цветков каштана конского обыкновенного (*Aesculi hippocastani flores*), заготовленных в различных регионах, позволило научно обосновать критерии качества исследуемого вида растительного сырья и разработать комплексную систему его стандартизации и оценки, включающую микроскопический, товароведческий, элементный и фитохимический анализ. Проведен первичный скрининг возможных видов биологической активности, получены и стандартизированы опытные лабораторные образцы водных и водно-спиртовых ЖЛФ на основе цветков каштана конского. Разработан проект НД (ФС) для их стандартизации, а также инструкция по заготовке и сушке данного сырья.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. На основании проведённых морфолого-анатомических исследований цветков каштана конского обыкновенного с применением комплекса методов микроскопического анализа установлены диагностические признаки для идентификации сырья: одноклеточные волоски и многоклеточные волоски с бородавчатой поверхностью на эпидермисе лепестка венчика и листка чашечки, циклоцитный тип устьичного аппарата, сосуды со спиральным и ленточным типом утолщения, перекручивающиеся и обламывающиеся простые одноклеточные трихомы по краю лепестка венчика и листка чашечки;

2. Определены товароведческие показатели качества цветков каштана конского обыкновенного и предложены их нормативы (влажность – не более 14%; золы общей – не более 10%; золы, нерастворимой в кислоте 10% хлористоводородной – не более 2%; минеральные примеси – не более 1%; органические примеси – не более 1%);

3. Методом масс-спектрометрии установлено присутствие 58 элементов в цветках каштана конского. Результаты оценки способности цветков к накоплению токсичных элементов, остаточных пестицидов и радионуклидов показали, что изучаемое сырье может считаться экологически безопасным;

4. Разработаны и валидированы спектрофотометрические методики определения целевых групп биологически активных веществ цветков каштана конского в сырье и лекарственных формах на его основе, а также рекомендованы нормативы их содержания с учётом региональной изменчивости. Сумма флавоноидов в пересчете на рутин (не менее 2%), сумма тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин (не менее 1%);

5. С применением современных физико-химических методов (спектрофотометрия, газовая хроматография с масс-детекцией, капиллярный электрофорез, тонкослойная хроматография, инфракрасная спектроскопия) изучена изменчивость накопления биологически активных веществ (флавоноиды, сапонины, стерины, лейкоантоцианы, полисахариды, дубильные вещества,

аминокислоты, органические кислоты и др.) цветков каштана конского различных регионов произрастания;

6. Методом *in silico* дана прогностическая оценка возможных фармакологических свойств целевых групп биологически активных веществ цветков каштана конского. Подтверждена *in vitro* антиокислительная активность извлечений из цветков каштана конского. В тесте «Острая токсичность» установлено отсутствие токсического действия водных извлечений на *Paramecium caudatum*, а в тесте «Функциональная нагрузка» - выраженное биостимулирующее и мембранопротекторное действие. Выбраны перспективные направления для дальнейшей разработки лекарственных растительных препаратов (антиоксидантного, мембранопротекторного, антигиперхолистеринемического, вазопротекторного и гепатопротекторного действия);

7. Получены и стандартизированы лабораторные образцы жидких водных и водно-спиртовых лекарственных форм на основе цветков каштана конского. Среди изученных опытных лабораторных образцов водных и водно-спиртовых извлечений можно выделить жидкий экстракт (1:1) и рекомендовать его в качестве оптимальной формы. Он демонстрирует наибольшее содержание целевых групп биологически активных веществ (флавоноидов и сапонинов);

8. Научно обоснована перспективность применения цветков каштана конского обыкновенного в качестве источника биологически активных веществ. Разработаны критерии оценки качества цветков каштана конского и проект фармакопейной статьи для их стандартизации.

Практические рекомендации

Для реализации государственных задач по созданию эффективных и безопасных лекарственных препаратов отечественного производства перспективным сырьём для производства ЛРП и БАД с антиоксидантным и флеботропным действием могут служить цветки конского каштана обыкновенного благодаря их богатому химическому составу и уникальному комплексу флавоноидов и сапонинов. Результаты диссертационного исследования данного растительного сырья легли в основу проекта ФС «Конского каштана обыкновенного цветки» для ГФ РФ, который был зарегистрирован в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. Оптимальным периодом заготовки цветков каштана конского является период массового цветения растения, в данное время достигается максимальное накопление сырьем целевых БАВ фенольной и тритерпеновой природы в совокупности с наибольшим объемом фитомассы.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Диссертационное исследование открывает путь для создания на основе цветков конского каштана новых перспективных, эффективных и безопасных фитопрепаратов, проявляющих гепатопротекторную, вазопротекторную, антиоксидантную, мембранопротекторную и антигиперхолестеринемическую активность. Следующим этапом исследования можно обозначить доклинические тесты *in vivo*. Параллельно для оценки изменчивости содержания целевых групп БАВ – флавоноидов и сапонинов в изучаемом сырье требуется проанализировать их динамику накопления в разные годы заготовки на всех изученных территориях произрастания производящего растения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АК – аминокислоты

АО - антиокислители

АОА – антиокислительная активность

БАВ – биологически активные вещества

БАВ-АО – биологически активные вещества-антиокислители

БАД – биологически активная добавка

БАС – биологически активные соединения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГОСТ – Государственный стандарт

ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации

ГХ/МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором

ЖЛФ – жидкие лекарственные формы

ИКС – инфракрасная спектроскопия

КЭ – капиллярный электрофорез

ЛП – лекарственный препарат

ЛРП – лекарственный растительный препарат

ЛРС – лекарственное растительное сырьё

ЛФ – лекарственная форма

НД – нормативная документация

ОФС – общая фармакопейная статья

РФ – Российская Федерация

РЭМ – растровая электронная микроскопия

СО – стандартный образец

СФМ – спектрофотометрия

ТС – тритерпеновые сапонины

ТСХ – тонкослойная хроматография

ФВК – фосфорновольфрамовая кислота

ФС – фармакопейная статья

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдурахманова, М. А. Идентификация и количественное определение тритерпеновых сапонинов, производных эсцина, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / М. А. Абдурахманова, И. Н. Зилфикаров, Н. Н. Бойко // Достижения и перспективы создания новых лекарственных растительных препаратов : сборник научных статей по материалам Международного научного Симпозиума, Москва, 04–06 июня 2025 года. – Москва : Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, 2025. – С. 225-230.

2. Азаркович, М. И. В рекальцитрантных семенах каштана конского нет белковых тел / М. И. Азаркович, Ю. П. Болякина // Физиология растений. – 2016. – Т. 63, № 4. – С. 532-538.

3. Аминокислотный состав каштана конского семян, заготовленных в Воронежской области / А. А. Гудкова, А. С. Чистякова, А. С. Болгов, А. Д. Дунилин // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации : сборник материалов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Электрогорск, Орехово-Зуево, 25 ноября 2022 года. – Электрогорск, Орехово-Зуево : Государственный гуманитарно-технологический университет, 2022. – С. 60-63.

4. Анализ рынка лекарственных препаратов, содержащих сырье каштана конского / И. А. Занина, А. Д. Дунилин, А. С. Чистякова, Ф. Д. Евсиков // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2023. – № 1 (39). – С. 37-42.

5. Анализ содержания тритерпеновых сапонинов в почках и листьях березы повислой (*Betula pendula* Roth.) / В. А. Девицкая, О. В. Нестерова, Д. А. Доброхотов, А. К. Жевлакова // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2023. – Т. 25, № 11. – С. 5-10.

6. Анатомо-диагностические признаки листьев каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) / Н. А. Постоюк, А. А. Маркарян, М.

А. Джавахян [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2012. – № 2. – С. 19-23.

7. Архив ежедневных осадков и температур, усредненных за много лет – Текст : электронный // Геоинформационная система «Метео измерения онлайн» : [сайт]. – URL: https://thermo.karelia.ru/weather/w_precips.shtml (дата обращения: 29.03.2026).

8. Атлас лекарственных растений России : словарь или справочник / В. А. Быков, Л. Н. Зайко, Н. Т. Конон [и др.] ; под общей редакцией В. А. Быкова. – Москва : Щербинская типография, 2006. – 352 с. – ISBN 5-87019-067-3.

9. Балагозян, Э. А. Определение стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной / Э. А. Балагозян, В. А. Куркин, О. Е. Правдивцева // Фармация. – 2016. – Т. 65, № 2. – С. 18-22.

10. Балагозян, Э. А. Фармакогностическое изучение корневищ с корнями крапивы двудомной как перспективного вида лекарственного растительного сырья / Э. А. Балагозян, О. Е. Правдивцева, В. А. Куркин // Сеченовский вестник. – 2016. – № S1. – С. 37.

11. Белов, П. В. Фармакогностическое исследование каштана конского обыкновенного (*Aesculus hyppocastanum* L.) как перспективного источника биологически активных веществ : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Белов Павел Викторович ; ФГБОУ ВО «Самарский государственный университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Самара, 2020. – 164 с.

12. Биологическая активность гелевой композиции на основе экстракта оболочек плодов *Aesculus hippocastanum* L. / А. В. Филатова, Л. Б. Азимова, С. Н. Гайибова, А. С. Тураев // Биофармацевтический журнал. – 2024. – Т. 16, № 1. – С. 31-35.

13. Богачев, В. Ю. Особенности лечения начальных форм хронических заболеваний вен / В. Ю. Богачев, О. В. Голованова, П. В. Ершов //

Стационарозамещающие технологии: Амбулаторная хирургия. – 2014. – № 3-4. – С. 15-20.

14. Богачев, В. Ю. Фармакотерапия хронических заболеваний вен. Новые европейские рекомендации / В. Ю. Богачев, С. В. Родионов, О. В. Дженина // Стационарозамещающие технологии: Амбулаторная хирургия. – 2018. – №3-4. – С. 12-21.

15. Богачев, В. Ю. Экстракт конского каштана. Update-2022 / В. Ю. Богачев, Б. В. Болдин, П. Ю. Туркин // Consilium Medicum. – 2022. – Т. 24, № 1. – С. 42-48.

16. Вандышев, В. В. Старинное лекарственное растение – конский каштан обыкновенный – источник современных эффективных лекарственных средств / В. В. Вандышев // Медицинская помощь. – 2002. – № 5. – С. 36–38.

17. Власова, Ю. С. Анализ органических кислот и тритерпеновых сапонинов в извлечениях из травы копеечника кустарникового / Ю. С. Власова, Е. Г. Коган, А. Н. Кисилева // Смоленский медицинский альманах. – 2017. – № 1. – С. 69-73.

18. Высокоэффективная тонкослойная хроматография при анализе тритерпеновых сапонинов *Gynostemma pentaphyllum* / А. А. Низамова, Э. Х. Галиахметова, Н. В. Кудашкина [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2021. – Т. 16, № 5 (95). – С. 21-26.

19. Габеев, В. Н. Изменчивость семян конского каштана обыкновенного в зеленых насаждениях Владикавказа / В. Н. Габеев, А. С. Калагова // Плодоводство, семеноводство, интродукция древесных растений. – 2011. – № XIV. – С. 18-21.

20. Голованова, О. В. Современный подход к лечению хронических заболеваний вен: место Эскузана во флебологической практике / О. В. Голованова, А. Н. Кузнецов // Фарматека. – 2016. – № 6 (319). – С. 39-44.

21. ГОСТ 32161-2013. Продукты пищевые. Метод определения содержания цезия Cs-137 : межгосударственный стандарт : издание официальное : введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 июня 2013 г. № 233-ст: введен впервые: дата введения 2014-07-01 : переиздание декабрь 2019 г. / подготовлен Федеральным государственным

унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт физико-технических и радиотехнических измерений» (ФГУП «ВНИИФТРИ»). – Москва : Стандартинформ, 2019. – III, 6 с. ; 29 см.

22. ГОСТ 32163-2013. Продукты пищевые. Метод определения содержания стронция Sr-90 : межгосударственный стандарт : издание официальное : введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 июня 2013 г. № 232-ст : введен впервые : дата введения 2014-07-01 : переиздание декабрь 2019 г. / подготовлен Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт физико-технических и радиотехнических измерений» Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (ФГУП «ВНИИФТРИ»). – Москва : Стандартинформ, 2019. – III, 6 с. ; 29 см.

23. ГОСТ Р 55569-2013. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение протеиногенных аминокислот методом капиллярного электрофореза : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 06 сентября 2013 г. № 841-ст : введен впервые : дата введения 2015-07-01 / разработан Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности» (ОАО «ВНИИКП»), Обществом с ограниченной ответственностью «ЛЮМЭКС-МАРКЕТИНГ» (ООО «ЛЮМЭКС-МАРКЕТИНГ»). – Москва : Стандартинформ, 2014. – II, 15 с. ; 29 см.

24. ГОСТ Р 57166-2016. Вода. Определение токсичности по выживаемости пресноводных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 17 октября 2016 г. № 1414-ст : введен впервые : дата введения 2018-01-01 / разработан Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного

хозяйства и океанографии» совместно с ООО «Протектор». – Москва : Стандартинформ, 2016. – III, 23 с. ; 29 см.

25. ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 23 ноября 2010 г. № 499-ст : введен впервые : дата введения 2012-03-01 / подготовлен Лабораторией проблем клинико-лабораторной диагностики ГОУ ВПО «Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова». – Москва : Стандартинформ, 2011. – IV, 17 с.

26. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издание: офиц. сайт. – URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/ (дата обращения: 24.01.2026).

27. Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV издание. – URL: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php (дата обращения 10.01.2026).

28. Гржибовский, А. М. Экологические (корреляционные) исследования в здравоохранении / А. М. Гржибовский, С. В. Иванов, М. А. Горбатова // Наука и здравоохранение. – 2015. – № 5. – С. 5-18.

29. Григорьев, М. А. Эколого-биологические особенности каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) в условиях юга Западной Сибири / М. А. Григорьев, А. И. Григорьев // Вестник ОмГАУ. – 2017. – № 3 (27). – С. 61-68.

30. Гусеинова, Г. А. Содержание сапонинов в листьях стевии (*Steviarebaudiana* Bertoni) / Г. А. Гусеинова, Г. Н. Умарова // Актуальные проблемы науки, производства и химического образования : материалы XIII Международной научно-практической конференции, Астрахань, 28–30 ноября 2022 года. – Астрахань : Астраханский государственный университет имени В. Н. Татищева, 2023. – С. 24-26.

31. Джупарова, И. А. Маркетинговый и фармако- экономический анализ ассортимента венотонизирующих лекарственных препаратов ОТС-сегмента / И. А. Джупарова, А. С. Джупаров // Сибирский медицинский вестник. – 2020. – № 4. – С. 27-29.

32. Дибиров, М. Д. Опыт применения Эскузана в лечении хронической венозной недостаточности у больных пожилого и старческого возраста / М. Д. Дибиров, Р. У. Гаджимурадов, М. Р. Какубава // Фарматека. – 2014. – № 20 (293). – С. 70-74.

33. Дикорастущие лекарственные растения России: сбор, сушка, подготовка сырья : сборник инструкций / В. А. Быков. – Москва : ВИЛАР, 2015. – 344 С.

34. Дунилин, А. Д. Вариабельность состава амино- и органических кислот цветков каштана конского обыкновенного / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева // Биофармацевтический журнал. – 2024. – Т.16, № 3. – С. 39-43.

35. Дунилин, А. Д. Изучение флавоноидов цветков каштана конского обыкновенного / А. Д. Дунилин, А. С. Чистякова // 90 лет - от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы : сборник материалов юбилейной международной научной конференции, Москва, 10–11 июня 2021 года. – Москва : Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", 2021. – С. 196-200.

36. Дунилин, А. Д. Исследование аминокислотного состава извлечений из цветков каштана конского различных регионов произрастания / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2025. – Т. 25, № 2. – С. 240-249.

37. Дунилин, А. Д. Исследование полисахаридного комплекса цветков каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева // Химия растительного сырья. – 2025. – № 4. – С. 291-299.

38. Дунилин, А. Д. Исследование состава биологически активных веществ цветков каштана конского обыкновенного методом ТСХ / А. Д. Дунилин, О. В.

Тринеева // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2026. – Т. 26, № 1. – С. 163-175.

39. Дунилин, А. Д. Исследование состава флавоноидов цветков каштана конского различных регионов произрастания / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2024. – Т. 24, № 4. – С. 581-591.

40. Дунилин, А. Д. Качественный анализ флавоноидов и сапонинов цветков каштана конского / А. Д. Дунилин, А. С. Болгов // Лучшая научно-инновационная работа 2021 : сборник статей II Международного научно-исследовательского конкурса, Петрозаводск, 14 сентября 2021 года. – Петрозаводск : Международный центр научного партнерства «Новая Наука», 2021. – С. 192-196.

41. Дунилин, А. Д. Морфолого-Анатомический анализ измельченного сырья и порошка цветков каштана конского обыкновенного различными методами / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2024. – № 4. – С. 78-87.

42. Дунилин, А. Д. Определение комплекса аминокислот цветков каштана конского произрастающего в Волгоградской области / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева // XXV Международный Съезд ФИТОФАРМ 2024 : сборник тезисов, Санкт-Петербург, 07–09 октября 2024 года. – Санкт-Петербург : Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. – С. 53-54.

43. Дунилин, А. Д. Определение содержания экстрактивных веществ в цветках каштана конского обыкновенного, заготовленного в Воронежской области / А. Д. Дунилин, А. С. Чистякова // Молодежь и наука: шаг к успеху : сборник научных статей 5-й Всероссийской научной конференции перспективных разработок молодых ученых. В 4-х томах, Курск, 22–23 марта 2021 года / Отв. редактор М. С. Разумов. Том 3. – Курск : Юго-Западный государственный университет, 2021. – С. 161-163.

44. Дунилин, А. Д. Определение товароведческих показателей качества Каштана конского обыкновенного / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева, Ю. А.

Бокарева // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2023. – Т. 26, № 4. – С. 123-128.

45. Дунилин, А. Д. Особенности заготовки растительного сырья каштана конского обыкновенного цветков в условиях Ботанического сада имени профессора Б. М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева, А. А. Воронин // Гербариум. – 2025. – Т. 2, № 4. – С. 9-16.

46. Дунилин, А. Д. Оценка возможных видов активности в-эсцина методом компьютерного моделирования / А. Д. Дунилин, А. С. Чистякова, А. А. Гудкова // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции, Воронеж, 31 марта – 02 апреля 2022 года / Под общей редакцией А. С. Беленовой, А. А. Гудковой. – Воронеж : Воронежский государственный университет, 2022. – С. 185-190.

47. Дунилин, А. Д. Оценка подлинности каштана конского обыкновенного цветков свежих методом микроскопического анализа / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции. Посвящается 25-летию создания фармацевтического факультета в Воронежском государственном университете, Воронеж, 28–29 сентября 2023 года / Под общей редакцией А. С. Беленовой, А. А. Гудковой, Н. А. Дьяковой. – Воронеж : Воронежский государственный университет, 2023. – С. 221-226.

48. Дунилин, А. Д. Оценка подлинности цветков каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) методом растровой электронной микроскопии / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14, № 1. – С. 245-253.

49. Дунилин, А. Д. Оценка радионуклидного загрязнения растительных ресурсов Воронежской области на примере каштана конского цветков / А. Д.

Дунилин, Ю. А. Бокарева, А. Р. Деева // Инновационный потенциал развития общества: взгляд молодых ученых : сборник научных статей 4-й Всероссийской научной конференции перспективных разработок, Курск, 01 декабря 2023 года. – Курск : Университетская книга, 2023. – С. 24-27.

50. Дунилин, А. Д. Разработка и валидация методики определения флавоноидов в цветках каштана конского различных регионов произрастания / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева, Т. Ю. Ковалева // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2024. – Т. 23, № 3. – С. 224-234.

51. Дунилин, А. Д. Стандартизация жидких водных и водно-спиртовых извлечений из цветков каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2026. – Т. 15, № 3. – С. 157-171.

52. Дунилин, А. Д. ТСХ-профилирование биологически активных веществ цветков каштана конского обыкновенного / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева // Ионообменные материалы в сорбционных, хроматографических и мембранных процессах - ИОНИТЫ-2025 : материалы XVI Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 175-летию открытия явления ионного обмена и 25-летию журнала "Сорбционные и хроматографические процессы", Воронеж, 19–21 ноября 2025 года. – Воронеж : Научная книга, 2025. – С. 96-98.

53. Дунилин, А. Д. Фитохимическое исследование цветков каштана конского различных регионов произрастания / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева, А. Р. Деева // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2024. – Т. 27, № 1. – С. 116-122.

54. Дьякова, Н. А. Фармацевтическая технология экстракционных препаратов : учебное пособие для вузов / Н. А. Дьякова, А. И. Сливкин. – 2-е изд., стереотип. – Санкт-Петербург : Лань, 2025. – 248 с. – ISBN 978-5-507-52363-4.

55. Дятлова, А. П. Исследование содержания сапонинов в растениях Новгородской области, перспективных для производства косметической продукции / А. П. Дятлова // Дни науки и инноваций НовГУ : сборник статей

студентов и молодых ученых. В 4-х частях. – Великий Новгород : Новгородский государственный университет им. Ярослава Мудрого, 2023. – С. 158-163.

56. Евсиков, Ф. Д. Физические методы, применяемые в современной фармакологии / Ф. Д. Евсиков, А. Д. Дунилин, А. А. Гудкова // Физические основы современных наукоемких технологий : материалы международного научно-методического семинара, Воронеж, 16 ноября 2021 года / Отв. редактор Н. Ю. Евсикова. – Воронеж : Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, 2022. – С. 85-94.

57. Ефименко, Н. В. Применение каштановых ванн в комплексном восстановительном лечении пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей / Н. В. Ефименко, А. С. Кайсинова // Курортная медицина. – 2016. – № 4. – С. 28-32.

58. Жарова, О. Г. Морфолого-анатомическое изучение семян конского каштана обыкновенного / О. Г. Жарова, Т. А. Сокольская, В. В. Вандышев // Фармация. – 2009. – № 1. – С. 18-21.

59. Жарова, О. Г. Стандартизация конского каштана обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) семян и экстракта сухого на их основе : специальность 15.00.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Жарова Олеся Глебовна ; Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений Российской академии сельскохозяйственных наук. – Москва, 2009. – 27 с.

60. Заигралова, Г. Н. Изменчивость морфологических признаков *Aesculus hippocastanum* L. (конского каштана обыкновенного) в зелёных насаждениях г. Саратова / Г. Н. Заигралова, С. В. Кабанов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2019. – №5 (79). – С. 128-132.

61. Зурабян, С. Э. Номенклатура природных соединений : справочное пособие / С. Э. Зурабян. – Москва : Гэотар-Медиа, 2008. – 204 с. – ISBN 978-5-9704-0904-6.

62. Изучение антиоксидантной и мембранпротекторной активности настоя цветков каштана конского обыкновенного / А. Д. Дунилин, А. С. Болгов, А. А. Гудкова, А. С. Чистякова // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции, Воронеж, 31 марта – 02 апреля 2022 года / Под общей редакцией А. С. Беленовой, А. А. Гудковой. – Воронеж : Воронежский государственный университет, 2022. – С. 181-185.

63. Изучение ассортимента растительного сырья, содержащего флавоноиды, реализуемого на фармацевтическом рынке Г. Воронеж / И. Ю. Поданенко, Д. Ю. Кострыкина, А. Д. Дунилин, А. С. Чистякова // Молодежь и системная модернизация страны : сборник научных статей 6-й Международной научной конференции студентов и молодых ученых, в 3-х томах, Курск, 20–21 мая 2021 года. Том 2. – Курск : Юго-Западный государственный университет, 2021. – С. 359-362.

64. Изучение биостимулирующего действия комплекса гуминовых и фульвокислот in vitro с использованием тест-системы Parametium caudatum / А. В. Бузлама, Е. А. Алексенко, А. Ю. Кузнецов, Т. Д. Есипенко // Клиническая фармакология в образовании, науке и практике : сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию образования кафедры клинической фармакологии КГМУ Минздрава России, Курск, 23 октября 2024 года. – Курск : Курский государственный медицинский университет, 2024. – С. 48-54.

65. Изучение биостимулирующего действия отвара листьев аронии Мичурина *in vitro* с пользованием тест-системы инфузорий *Paramecium caudatum* / О. В. Пугачева, А. В. Бузлама, А. Ю. Кузнецов, О. В. Тринеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2025. – Т. 14, № 2. – С. 225-241.

66. Изучение липидов семян конского каштана обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) / О. Г. Жарова, В. И. Шейченко, Т. А. Сокольская, В. В.

Вандышев // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2008. – №8. – С. 263-269.

67. Изучение органических кислот и аминокислотного состава каштана конского цветков / А. С. Чистякова, А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13, № 2. – С. 125-132.

68. Изучение полисахаридного комплекса, выделенного из *Aesculus hippocastanum* L. / Л. Б. Азимова, А. В. Филатова, А. С. Тураев, Д. Т. Джурабаев // Химия растительного сырья. – 2021. – № 3. – С. 115-122.

69. Изучение полисахаридов побегов и листьев смородины черной / О. В. Яборова, В. Д. Белоногова, И. В. Алексеева, С. А. Соснина // Медико-фармацевтический журнал Пульс. – 2024. – Т. 26, № 6. – С. 81-86.

70. Изучение тритерпеновых соединений в побегах *Crataegus alma-atensis* Pojark / Н. Б. К. Жалалова, Н. В. Кудашкина, С. Р. Хасанова, А. Д. Мураталиева // Известия Национальной Академии наук Кыргызской Республики. – 2023. – № S7. – С. 125-128.

71. Изучение углеводного состава синюхи голубой (*Polemonium caeruleum* L.) / А. А. Гудкова, Г. Ю. Шестакова, А. И. Сливкин [и др.] // Химия растительного сырья. – 2021. – № 3. – С. 107-114.

72. Изучения антиэкссудативное действие геля "Гинговен" - нового препарата для лечения хронической венозной недостаточности нижних конечностей // Л. В. Яковлева, И. В. Трутаев, А. А. Пастухов, Е. А. Ковалева // Клиническая фармация. – 2009. – Т. 13, № 3. – С. 46-49.

73. ИК-фурье-спектроскопия межмолекулярного взаимодействия эсцина с L-лизином / Л. А. Яковишин, В. И. Гришковец, Ж. Н. Кравчук, В. Н. Никитина // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Серия: Биология, химия. – 2012. – Т. 25 (64), № 1. – С. 320-326.

74. Ильина, Т. А. Лекарственные растения России : иллюстрированная энциклопедия / Т. А. Ильина. – Москва : Эксмо, 2006. – 192 с. – ISBN 5-699-16327-1.

75. Исследование антиокислительной активности цветков каштана конского различных регионов произрастания методом дифференциальной спектрофотометрии / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева, А. О. Ларина, И. В. Давыдов // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2025. – Т. 28, №1. – С. 109-118.

76. Исследование влияния экстракта хлорофитума хохлатого (*Chlorophytum comosum*) на рост микроорганизмов-пробионтов / Н. И. Бондарева, Л. Д. Тимченко, И. В. Ржепаковский, А. В. Лыхварь // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – С. 625.

77. Исследование метаболома перикарпия Aesculus hippocastanum L. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением масс-селективного детектирования / К. Р. Вишнякова, Е. Ю. Лапко, Н. М. Потемкина [и др.] // Известия ГГТУ. Медицина, фармация. – 2026. – № 1 (25). – С. 37-41.

78. Исследование петиолярной анатомии листьев каштана конского как перспективного источника биологически активных соединений / П. В. Белов, В. А. Куркин, В. М. Рыжов [и др.] // Аспирантский вестник Поволжья. – 2019. – № 1-2. – С. 6-12.

79. Исследование рынка флеботропных лекарственных препаратов, применяемых при лечении варикозной болезни 36 вен нижних конечностей (без язв и воспалений) / Н. Н. Чеснокова, С. В. Кононова, С. В. Петрова, Д. В. Писаненко // Ремедиум. – 2017. – № 5. – С. 36-42.

80. Карбасникова, Е. Б. Оценка перспективности интродукции каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) в условиях г. Вологды / Е. Б. Карбасникова // Лесной вестник. – 2020. – № 6. – С. 58-64.

81. Каюмов, Х. Н. Перспективное лекарственное растение каштан конский / Х. Н. Каюмов, Ф. Т. Халимова, И. Д. Кароматов // Биология и интегративная медицина. – 2025. – № 4 (76). – С. 463-488.

82. Кияшко, В. А. Консервативное лечение хронической венозной недостаточности / В. А. Кияшко // Русский медицинский журнал. – 2002. – № 26. – С.14-19.

83. Кобзарь, В. Н. Энтомофильная пыльца и пчелы как биомониторы и биоиндикаторы антропогенной триады / В. Н. Кобзарь, Н. А. Пересадин // Бюллетень науки и практики. – 2024. – Т. 10, № 8. – С. 91-107.

84. Ковалёва, Н. А. Фармакогностическое изучение облепихи крушиновидной листьев : специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Ковалёва Наталья Александровна ; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). – Москва, 2026. – 282 с.

85. Когда собирать каштан конский. – Текст : электронный // Lechilka.com : [сайт]. – URL: https://lechilka.com/kogda-sobirat-kashtan-konskij.html (дата обращения: 19.08.2023).

86. Количественное определение суммы тритерпеновых сапонинов в корневищах с корнями синюхи / Ю. А. Голяк, О. М. Хишова, Н. В. Дубашинская, Л. В. Кухарева // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42, № 8. – С. 16-19.

87. Количество солнечных дней. – Текст : электронный // ANYROAD : [сайт]. – URL: https://anyroad.ru/city/weather/sunnydays/санкт-петербург,ленинградская-область (дата обращения: 29.03.2026).

88. Колосова, О. А. Сравнительное фармакогностическое изучение сырья валериан сомнительной и волжской, произрастающих на территории Воронежской области : специальность 3.4.2 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Колосова Ольга Александровна ; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). – Москва, 2022. – 281 с.

89. Комарова, Н. В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель» / Н. В. Комарова, Я. С. Каменцев. – Санкт-Петербург : Веда, 2006. – 212 с. – ISBN 5-903297-01-3.

90. Компонентный состав фенольных соединений и терпеноидов растительного сбора ангиопротекторного / В. М. Мирович, А. А. Посохина, С. А. Петухова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2021. – № 4. – С. 145-155.

91. Крамар, Г. І. Analysis of the assortment of venotonic medicines in the pharmaceutical market of Ukraine / Г. І. Крамар, О. В. Макаренко, О. І. Альчук // Фармацевтичний журнал. – 2025. – №. 1. – P. 14-31.

92. Краснюк, И. И. Фармацевтическая технология. Технология лекарственных форм : руководство к практическим занятиям : учебное пособие / И. И. Краснюк, Г. В. Михайлова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 544 с. – ISBN 978-5-9704-2529-9.

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

94. Куркин, В. А. Фармакогнозия : учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов) : для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 (060301) – «Фармация» / В. А. Куркин ; Министерство образования и науки Российской Федерации [и др.]. – 3-е изд., перераб. и доп. – Самара : Офорт, 2016. – 1279 с. – ISBN 978-5-473-10190-9.

95. Куркин, В. А. Флавоноиды почек каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) / В. А. Куркин, П. В. Белов // Химия растительного сырья. – 2020. – №3. – С. 123-129.

96. 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.

97. Кучина, Н. Л. Лекарственные растения Средней полосы Европейской части России / Н. Л. Кучина. – Москва : Планета, 1992. – 188 с. – ISBN 5-85250-503-х.

98. Лекарственная продукция из натуральных растений. – Текст : электронный // Здоровье Health. Фиточаи и сборы из лекарственных трав : [сайт]. – URL: https://lektrava.ru/encyclopedia/kashtan-konskiy/ (дата обращения: 16.08.2023).

99. Лисовский, П. Категория «венотоники» - увеличиваем доходность / П. Лисовский // Ремедиум. – 2018. – № 12. – С. 34-39.

100. Мазнев, Н. И. Энциклопедия лекарственных растений : справочное издание / Н. И. Мазнев. – 3-е изд., испр. и доп. – Москва : Мартин, 2004. – 496 с.

101. Маркетинговые исследования лекарственных растительных препаратов на основе семян каштана конского обыкновенного, представленных в аптечном ассортименте на фармацевтическом рынке города Воронежа / А. Д. Дунилин, А. С. Чистякова, М. С. Куролап, Ф. Д. Евсиков // The Scientific Heritage. – 2021. – № 79-1 (79). – С. 15-17.

102. Методы фармакогностического анализа лекарственного растительного сырья : учебное пособие : в 2 частях / Г. И. Калинкина, Е. Н. Сальникова, Н. В. Исайкина, Н. Э. Коломиец. – Томск: СибГМУ, 2008. – Ч II: Химический анализ. – 2017. – 55 с.

103. Морфолого-анатомическое исследование семян каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) методом люминесцентной микроскопии / Н. С. Соколов, П. В. Белов, В. А. Куркин [и др.] // Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы : сборник материалов, Самара, 07 октября 2017 года / Под редакцией В. А. Куркина. – Самара : Самарский государственный медицинский университет, 2017. – С. 138-148.

104. МР 2.3.1.1915 – 04. Рациональное питание. Рекомендуемые уровни потребления пищевых и биологически активных веществ : методические рекомендации : издание официальное : утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом : введены в действие с момента утверждения : дата введения 02-07-2004 //

Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: https://docs.cntd.ru/document/1200037560 (дата обращения: 17.02.2026).

105. Мубаракшина, О. А. Применение препаратов экстракта конского каштана в практике лечения хронических заболеваний вен / О. А. Мубаракшина, М. Н. Сомова, Ю. М. Дронова // Терапия. – 2017. – № 6 (16). – С. 114-120.

106. МУК 4.1.1483 – 03. Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной аргоновой плазмой : методические указания : издание официальное : утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации - Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г.Онищенко : введены впервые : дата введения 2003-06-30 // Кодекс: электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. URL: https://docs.cntd.ru/document/1200032531 (дата обращения: 17.02.2026).

107. Муравьева, Д. А. Фармакогнозия : учебник для студентов фармацевтических ВУЗов / Д. А. Муравьева, И. А. Самылина, Г. П. Яковлев. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва : Медицина, 2007. – 656 с. – ISBN 5-225-04714-9.

108. Наследов, А. Д. Математические методы психологического исследования. Анализ и интерпретация данных : учебное пособие / А. Д. Наследов. – 3-е изд., стереотип. – Санкт-Петербург : Речь, 2007. – 392 с. – ISBN 5-9268-0275-7.

109. Нгуен Тхи Ким Нган. Разработка методики количественного определения сапонинов в клубнелуковицах ариземы единокровной / Нгуен Тхи Ким Нган, В. А. Ермакова, И. А. Самылина // Молодые ученые и фармация XXI века : сборник научных трудов третьей научно-практической конференции с международным участием, Москва, 15 декабря 2015 года. – Москва : Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-

исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", 2015. – С. 311-315.

110. Определение сапонинов в листьях Дурнишника обыкновенного / А. А. Мухин, Ш. О. Джумамырадов, К. Н. Телешева [и др.] // Современная химия - основа устойчивого развития : сборник материалов III Международной научно-практической конференции, Астрахань, 25–27 мая 2021 года / Под редакцией А. В. Великородова, Э. Ф. Матвеевой. – Астрахань : Астраханский университет, 2021. – С. 119-121.

111. Определение сапонинов и флавоноидов в жидких водно-спиртовых лекарственных формах из цветков каштана конского методом ТСХ / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева, А. О. Ларина, Д. А. Макеева // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2026. – Т. 25, № 2. – С. 201-210.

112. Определение суммы полисахаридов корней одуванчика лекарственного *Taraxacum officinale* Wigg., произрастающего на Северном Кавказе / А. О. Сущенко, Е. В. Компанцева, Е. А. Масловская, Т. М. Дементьева // Международный научно-исследовательский журнал. – 2022. – № 9 (123).

113. Оценка подлинности каштана конского обыкновенного цветков методами микроскопического анализа / А. С. Чистякова, А. А. Сорокина, А. Д. Дунилин [и др.] // Фармация. – 2021. – Т. 70, № 7. – С. 32-36.

114. Патент № 2170930 Российская Федерация, МКП G01N33/50, G01N33/52. Способ определения антиокислительной активности : № 2000111126/14 : заявл. 05.05.2000 : опубл. 20.07.2001 / Максимова Т. В., Никулина И. Н., Пахомов В. П. [и др] ; заявитель и патентообладатель Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова. – 5 с.

115. Патент № 2599014 Российская Федерация, МПК G01N 33/98 (2006.01), G01N 21/31 (2006.01). Способ количественного определения стеринов в корневищах с корнями крапивы двудомной : № 2015136340/15 : заявл. 26.08.2015 : опубл. 10.10.2016 / Куркин В. А., Правдивцева О. Е., Балагозян Э. А. ; заявитель и патентообладатель федеральное государственное бюджетное образовательное

учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 10 с.

116. Патент № 2642264 Российская Федерация, МПК G01N 30/90 (2006/01). Способ определения простых сахаров в тонком слое сорбента : № 2016110353 : заявл. 21.03.2016 : опубл. 24.01.2018 / Тринеева О. В., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И., Назарова А. А. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет». – 17 с.

117. Патент № 2712069 Российская Федерация, МПК G01N 33/15 (2006.01), G01N 33/52 (2006.01), G01N 21/75 (2006.01). Способ определения антиокислительной активности лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов методом дифференциальной спектрофотометрии : № 2018120667 : заявл. 04.06.2018 : опубл. 24.01.2020 / Тринеева О. В., Рудая М. А., Сливкин А. И. ; заявитель и патентообладатель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет». – 14 с.

118. Патент № 2722746 Российская Федерация, МПК G01N 33/15 (2006.01). Способ определения тритерпеновых сапонинов группы β-амирина в растительном сырье и лекарственных препаратах на их основе : № 2019115730 : заявл. 22.05.2019 : опубл. 03.06.2020 / Мироненко Н. В., Селеменев В. Ф., Смусева С. О. [и др.] ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет». – 11 с.

119. Патент № 2790821 Российская Федерация, МПК G01N 33/15 (2006.01), A61K 36/42 (2006.01). Способ количественного определения сапонинов в траве гиностеммы пятилистной : № 2022118006 : заявл. 01.07.2022 : опубл. 28.02.2023 / Галиахметова Э. Х., Низамова А. А., Кудашкина Н. В. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 12 с.

120. Патент № 2862904 Российская Федерация, МПК G01N 33/52 (2006.01). Способ определения антиокислительной активности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов методом обратной цериметрии : № 2025123445 : заявл. 25.08.2025 : опубл. 26.05.2026 / Тринеева О. В., Дунилин А. Д., Гудкова А. А. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет». – 21 с.

121. Подбор параметров выделения индивидуальных бав из конского каштана, произрастающего на территории Калининградской области / В. В. Ларина, С. С. Воронова, А. Д. Попов, О. О. Бабич // XI Конгресс молодых учёных : сборник научных трудов конгресса, Санкт-Петербург, 04–08 апреля 2022 года. Том 2. – Санкт-Петербург : федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Национальный исследовательский университет ИТМО", 2022. – С. 287-292.

122. Позднякова, Т. А. Изучение качественного состава и количественного содержания сапонинов в траве астрагала солодколистного (Astragalus glycyphyllus L.) / Т. А. Позднякова, Р. А. Бубенчиков // Андреевские чтения. Трансляционная медицина. Опыт научных исследований в клиническую практику : сборник статей Всероссийской юбилейной научно-практической конференции с международным участием посвященной 100-летию ОГУ имени И.С. ТУРГЕНЕВА и 20-летию Медицинского института, Орёл, 11–12 декабря 2019 года. – Орёл : Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, 2019. – С. 170-180.

123. Позднякова, Т. А. Изучение тритерпеновых соединений астрагала белостебельного (*Astragalus albicaulis* DC) / Т. А. Позднякова, Р. А. Бубенчиков // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – Т. 19, № 12. – С. 24-27.

124. Полухина, Т. С. Количественное содержание тритерпеновых сапонинов в сырье *Salvia stepposa* Schost / Т. С. Полухина, N. А. Сальникова, К. Ш. Алахвердиева // Прикаспийский вестник медицины и фармации. – 2021. – Т. 2, № 4. – С. 19-23.

125. Попова, Т. С. Тритерпеновые сапонины в листьях и почках черной смородины / Т. С. Попова, Н. С. Терёшина // Фармация. – 2015. – № 8. – С. 3-5.

126. Посохина, А. А. Определение показателей подлинности сбора ангиопротекторного / А. А. Посохина // Природные соединения и здоровье человека : сборник научных статей Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием, Иркутск, 26 мая 2023 года. Том Выпуск 5. – Иркутск : Иркутский государственный медицинский университет, 2023. – С. 223-227.

127. Постоюк, Н. А. Фармакогностическое изучение и стандартизация каштана конского обыкновенного листьев (*Aesculus hippocastanum* L.) и экстракта сухого на его основе : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Постоюк Наталья Александровна ; Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений РАСХН. – Москва, 2013. – 23 с.

128. Правила сбора и сушки лекарственных растений : сборник инструкций / Министерство здравоохранения СССР, Главное аптечное управление, Всесоюзное информационное бюро [и др.]. – Москва : Медицина, 1995. – 328 с.

129. Применение геля с экстрактом конского каштана при хроническом тромбофлебите / А. С. Кайсинова, М. Б. Узденов, Ф. М. Хапаева [и др.] // Курортная медицина. – 2023. – № 3. – С. 41-46.

130. Применение зонного капиллярного электрофореза для определения сапонинов в водных растворах / А. В. Калач, А. И. Ситников, Н. Ю. Страшилина, В. Ф. Селеменев // Химия растительного сырья. – 2006. – № 4. – С. 39-43.

131. Прогноз по Санкт-Петербургу. – Текст : электронный // Северо-Западное управление по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды : [сайт]. – URL: www.meteo.nw.ru (дата обращения: 29.03.2026).

132. Пугачева, О. В. Валидация методики количественного определения антоцианов в аронии Мичурина листьях / О. В. Пугачева, О. В. Тринеева, К. Е

Панова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2023. – Т. 22, № 4. – С. 214-222.

133. Пугачева, О. В. Изучение ТСХ-профиля лейкоантоцианов листьев аронии Мичурина / О. В. Пугачева, О. В. Тринеева // XXV Международный Съезд ФИТОФАРМ 2024 : сборник тезисов, Санкт-Петербург, 07–09 октября 2024 года. – Санкт-Петербург : Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. – С. 108-109.

134. Пугачева, О. В. Фармакогностическое изучение и стандартизация аронии Мичурина листьев : специальность 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Пугачева Ольга Валериевна ; ФГБОУ ВО «Самарский государственный университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Самара, 2025. – 224 с.

135. Пупыкина, К. А. Изучение сапонинов ярутки полевой (*Thlaspi arvense* L.) / К. А. Пупыкина, Е. Ф. Королева // Химия растительного сырья. – 2024. – № 4. – С. 224-231.

136. Разработка и валидация методики количественного определения содержания тритерпеновых сапонинов в сухом экстракте из околоплодников стиракса лекарственного (*Styrax officinalis* L.) / З. Хамама, В. А. Ивлев, С. Н. Суслина, С. Лазар // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – Т. 20, № 6. – С. 88-92.

137. Разработка методики количественного определения антоцианов в плодах облепихи крушиновидной / О. В. Тринеева, А. И. Сливкин, И. А. Самылина, М. А. Казьмина // Фармация. – 2015. – № 7. – С. 9-13.

138. Разработка методики количественного определения сапонинов в траве грыжника голого - *Herniaria glabra* L. / М. Х. Эль, И. Е. Каухова, В. В. Сорокин, С. А. Минина // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2014. – № 24 (195). – С. 235-238.

139. Разработка методики определения антоцианов в лекарственном растительном сырье / В. А. Куркин, Т. К. Рязанова, А. В. Куркина, А. В. Егорова // Фармация. – 2014. – № 4. – С. 17-20.

140. Разработка технологии и анализа экстракта жидкого из листьев и цветков каштана конского обыкновенного в качестве противовоспалительного и венотонирующего средства / Л. Н. Савченко, Т. Ф. Маринина, В. А. Карпенко, А. С. Саушкина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2015. – Т. 17, № 5-2. – С. 612-617.

141. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах / Г. И. Олешко, Т. И. Ярыгина, Е. В. Зорина, М. Д. Решетникова // Фармация. – 2011. – № 3. – С. 14-17.

142. Рубцов, Л. И. К вопросу о долговечности декоративных деревьев / Л. И. Рубцов // Бюллетень Главного ботанического сада. – 1954. – Вып. 18. – С. 41–48.

143. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств : в 2 частях / Под редакцией А. Н. Миронова. – Москва : Гриф и К, 2012. – 944 с. – ISBN 978-5-.

144. Сальникова, Н. А. Содержание сапонинов в плодах *Amorpha fruticosa*, произрастающей на территории Астраханской области / Н. А. Сальникова, Т. С. Полухина // Прикаспийский вестник медицины и фармации. – 2020. – Т. 1, № 1. – С. 31-36.

145. Сапонины и их определение в корневищах аралии маньчжурской в условиях Белгородской области / Д. И. Писарев, Н. А. Мартынова, Н. Н. Нетребенко [и др.] // Химия растительного сырья. – 2009. – № 4. – С. 197-198.

146. Саушкина, А. С. Фитохимическое исследование листьев и цветков каштана конского обыкновенного / А. С. Саушкина, Л. Н. Савченко, Т. Т. Лихота // III Гаммермановские чтения : сборник научных трудов научно-методической конференции, Санкт-Петербург, 31 января – 03 февраля 2017 года. – Санкт-Петербург : Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-

фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2017. – С. 110-113.

147. Сергалиева, М. У. Условия экстрагирования сапонинов *Solidágo virgáurea* / М. У. Сергалиева, А. В. Самотруев, А. А. Цибизова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11, № 3. – С. 91-96.

148. Скрининг биостимулирующих и биоцидных веществ (адаптогены, бактерициды и другие препараты) / С. В. Шабунин, В. С. Бузлама, Т. И. Ермакова [и др.]. – Воронеж : Воронежский государственный аграрный университет им. Императора Петра I, 2006. – 51 с.

149. Содержание фитостеринов в цветках каштана конского и перспективы разработки препаратов на их основе / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева, Е. А. Платонова, Э. М. Магеррамова // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2025. – № 1. – С. 131-139.

150. Соколовская, М. С. Химический состав и свойства каштана конского (*Aesculus* L.). применение его компонентов в медицине / М. С. Соколовская // Современные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации : сборник статей XVI Международной научно-практической конференции, Пенза, 05 января 2021 года. – Пенза : Наука и Просвещение, 2021. – С. 288-292.

151. Соловьева, Э. Ю. Использование комплексных препаратов в терапии сосудистых нарушений различного происхождения / Э. Ю. Соловьева, Ш. П. Абдуллаев // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2022. – Т. 6, № 8. – С. 443-450.

152. Состав биологически активных веществ каштана конского (*Aeculus hippocastanum* L.) / В. П. Курченко, Н. В. Сушинская, К. И. Майорова [и др.] // Экобиотех. – 2021. – Т. 4, № 1. – С. 33-39.

153. Спектрофотометрическое определение суммы сапонинов в плодах дерезы китайской *Lycium chinense* Mill. / Я. П. Моисеев, Е. Е. Курдюков, А. В. Митишев [и др.] // Химия растительного сырья. – 2021. – № 2. – С. 123-128.

154. Стандартизация густого экстракта каштана конского / Е. Н. Жукович, Л. А. Шарикова, Т. Ф. Прибыткова [и др.] // Фармация. – 2005. – № 2. – С. 12-14.

155. Сунгурова, Т. Н. Мониторинг насаждений *Aesculus hippocastanum* L. на территории г. Челябинска и его окрестностей / Т. Н. Сунгурова // Вестник Челябинского государственного педагогического университета. – 2009. – № 12. – С. 337-344.

156. Технология выделения полисахаридов из оболочек плодов каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) и изучение его химического состава / А. В. Филатова, Д. Т. Джурабаев, Л. Б. Азимова, А. С. Тураев // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. – 2022. – Т. 65, №7. – С. 88-93.

157. Технология переработки плодов и листьев каштана конского / Г. И. Касьянов, Л. А. Русанова, О. И. Квасенков, И. Нематуллаев // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 1996. – №5-6 (234-235). – С. 86-87.

158. Тринеева, О. В. Изучение углеводного комплекса плодов облепихи крушиновидной различными методами / О. В. Тринеева, А. И. Сливкин // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2020. – № 2. – С. 91-98.

159. Тринеева, О. В. Изучение химического состава плодов облепихи крушиновидной, произрастающей на территории Центрального Черноземья / О. В. Тринеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 1. – С. 84-94.

160. Тринеева, О. В. Исследование профиля биологически активных веществ плодов облепихи крушиновидной различных сортов методом капиллярного электрофореза / О. В. Тринеева, М. А. Рудая, А. И. Сливкин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2019. – Т. 8, № 1. – С. 38-42.

161. Тринеева, О. В. Определения простых сахаров в лекарственном растительном сырье методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной) / О. В. Тринеева, А. И. Сливкин // Химия растительного сырья. – 2020. – № 1. – С. 215-222.

162. Тринеева, О. В. Профиль биологически активных веществ листьев аронии мичурина, произрастающей в условиях Центрального Черноземья / О. В. Тринеева, О. В. Пугачева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2024. – Т. 13, № 2. – С. 48-58.

163. Тринеева, О. В. Сравнительная характеристика определения сахаров различными методами в листьях крапивы двудомной / О. В. Тринеева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9, № 2. – С. 91-97.

164. Тринеева, О. В. Теоретические и методологические подходы к стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья и масляных экстрактов на его основе : специальность 14.04.02 "Фармацевтическая химия, фармакогнозия" : диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Тринеева Ольга Валерьевна ; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова. – Москва, 2017. – 441 с.

165. Тритерпеновые гликозиды аралиевых: методы выделения и установления структуры / В. И. Гришковец, В. Я. Чирва, В. В. Качала, А. С. Шашков // Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. – 2007. – Т. 127. – С. 97-107.

166. Тритерпеновые сапонины лекарственных препаратов «Бронхипрет сироп» и «Гербион сироп плюща» / Л. А. Яковишин, В. Д. Ратников, П. И. Бажан, В. И. Гришковец // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2020. – Т. 6 (72), № 1. – С. 299-307.

167. ТСХ-профиль антоциановых соединений плодов облепихи крушиновидной различных сортов / М. А. Рудая, О. В. Тринеева, А. И. Сливкин, С. М. Фомин // II Международная научная конференция "Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства" по направлению "Метаболомика и качество жизни", Москва, 06–07 июня 2019 года. – Москва : Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", 2019. – С. 527-530.

168. Уранова, В. В. Определение содержания тритерпеновых сапонинов растительного сырья *Scutellaria baicalensis* Georgi и *Scutellaria galericulata* L. в зависимости от возраста растения / В. В. Уранова, И. Е. Лепёхина, Н. А. Ломтева // Chemical Bulletin. – 2023. – Т. 6, № 1. – С. 13-20.

169. Фармакотерапия хронических заболеваний вен. Что мы знаем об экстракте конского каштана? / В. Ю. Богачев, Б. В. Болдин, М. Р. Кузнецов, С. В. Родионов // РМЖ. – 2019. – Т. 27, № 8-2. – С. 94-97.

170. Федосеева, Л. М. Изучение сапонинов в подземных органах ферулы хермонской / Л. М. Федосеева, Б. Б. Дали // Химия растительного сырья. – 2016. – № 1. – С. 181-184.

171. Филатова, А. В. Оценка фармакологической активности полисахаридов *Aesculus hippocastanum* L. / А. В.Филатова, Л. Б. Азимова, Л. У. Махмудовю // Химико-фармацевтический журнал. – 2023. – Т. 57, № 7. – С. 13-17.

172. Фитохимическое исследование листьев Aesculus hippocastanum L. и сухих экстрактов, полученных из них / М. А. Ханина, М. Г. Лежнина, И. В. Швец, А. П. Родин // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции. Посвящается 25-летию создания фармацевтического факультета в Воронежском государственном университете, Воронеж, 28 – 29 сентября 2023 года / Под общей редакцией А. С. Беленовой, А. А. Гудковой, Н. А. Дьяковой. – Воронеж : Воронежский государственный университет, 2023. – С. 407-411.

173. ФР.1.31.2010.06997 МВИ 002-ХМС-2009. Методика измерений массовых долей 62 элементов в почвах, донных отложениях, горных породах и сплавах цветных металлов методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой : дата введения 12.01.2015 // Томск : ООО «Химико-аналитический центр «Плазма». URL: https://www.plasma-tomsk.ru/our-methods (дата обращения: 02.08.2022).

174. Халилова, Р. С. Кровохлёбка лекарственная, альпийская / Р. С. Халилова, И. Д. Кароматов // Биология и интегративная медицина. – 2021. – № 3 (50). – С. 153-173.

175. Химический анализ лекарственных растений : учебное пособие для фармацевтических вузов / Е. Я. Ладыгин, Л. Н. Сафронич, В. Э. Отряшенкова [и др.] ; под редакцией Н. И. Гринкевич, Л. Н. Сафронич. – Москва : Высшая школа, 1983. – 176 с.

176. Цветут каштаны. – Текст : электронный // ГлобалЛаб : [сайт]. – URL: https://globallab.ru/ru/project/list/chestnuts_in_blossom/findings#37065730-A14D-48AF-B7E7-3DBA421AEA90 (дата обращения: 19.08.2023).

177. Чиглакова, А. О. Количественное определение сапонинов *Sapindus mukorossi* в лекарственном растительном сырье / А. О. Чиглакова // Forcipe. – 2020. – Т. 3, № 1. – С. 448-449.

178. Чистякова, А. С. Анализ свободных аминокислот каштана конского обыкновенного цветков / А. С. Чистякова, А. С. Болгов, А. Д. Дунилин // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции. Посвящается 25-летию создания фармацевтического факультета в Воронежском государственном университете, Воронеж, 28–29 сентября 2023 года / Под общей редакцией А. С. Беленовой, А. А. Гудковой, Н. А. Дьяковой. – Воронеж : Воронежский государственный университет, 2023. – С. 424-427.

179. Шадрин, Д. М. Распространение, классификация, методы обнаружения и выделения сапонинов из растительного сырья и их биологическая активность / Д. М. Шадрин, И. Ф. Чадин // Вестник института биологии Коми научного центра уральского отделения РАН. – 2010. – №1. – С. 15-23.

180. Шмыгарева, А. А. Сравнительный обзор методологических подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего сапонины / А. А. Шмыгарева, М. В. Лабковская // Оренбургский медицинский вестник. – 2022. – Т. 10, № 2 (38). – С. 46-48.

181. Элементный состав каштана конского (*Aesculus hippocastanum* L.) цветков, произрастающего в воронежской области / А. Д. Дунилин, О. В. Тринеева, А. С. Чистякова, А. А. Гудкова // Микроэлементы в медицине. – 2023. – Т. 24, № 3. – С. 46-56.

182. Эркебаева, А. Н. Качественный анализ тритерпеновых соединений в побегах боярышника алма-Атинского / А. Н. Эркебаева // Студент года 2023 : сборник статей II Международного учебно-исследовательского конкурса, Петрозаводск, 06 декабря 2023 года. – Петрозаводск : Международный центр научного партнерства "Новая Наука", 2023. – С. 291-294.

183. Эскузан. – Текст : электронный // Государственный реестр лекарственных средств : [сайт]. – URL: https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=c1cdab38-a0a4-4b3b-be19-1672330b2635 (дата обращения: 06.01.2026).

184. Эсмурзиева, З. А. Содержание сапонинов в траве лебеды татарской, произрастающей в Астраханской области / З. А. Эсмурзиева // Актуальные проблемы химии и образования : материалы III научно-практической конференции студентов и молодых ученых, Астрахань, 29 мая 2018 года. – Астрахань : Без издательства, 2018. – С. 146-149.

185. Яковишин, Л. А. Анализ лекарственного препарата «Бронхофитол плющ» / Л. А. Яковишин, В. И. Гришковец // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2024. – Т. 10, № 1. – С. 316-322.

186. Яковишин, Л. А. Исследование тритерпеновых и стероидных сапонинов фитокомплекса «Хедерикс+» / Л. А. Яковишин, В. И. Гришковец, Е. Н. Корж // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2016. – Т. 1, № 2. – С. 146-148.

187. Яковишин, Л. А. Сапонины фитокомплекса «Хедерикс+» / Л. А. Яковишин, В. И. Гришковец, Е. Н. Корж // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2015. – Т. 1 (67), № 4. – С. 163-169.

188. Яковишин, Л. А. Способ выделения главных тритерпеновых гликозидов из листьев плюща / Л. А. Яковишин, В. И. Гришковец // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2018. – Т. 4 (70), № 2. – С. 226-234.

189. Яковишин, Л. А. Тритерпеновые сапонины лекарственного препарата плюща сироп / Л. А. Яковишин, В. И. Гришковец // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2023. – Т. 9, № 1. – С. 302-308.

190. Яковишин, Л. А. Химико-фармацевтический анализ биологически активной добавки к пище «Сироп плюща Бронхолор» / Л. А. Яковишин, В. И. Гришковец // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2022. – Т. 8, № 2. – С. 293-300.

191. Яковлев, Г. П. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия : учебное пособие по фармакогнозии для студентов фармацевтических вузов, обучающихся по специальности «Фармация» / Г. П. Яковлев, К. Ф. Блинова. – СПб. : СпецЛит, 2004. – 765 с. – ISBN 5-299-00267-X.

192. Яковлева, Л. В. Сравнительный анализ фармакологической активности нового венотонизирующего средства растительного происхождения капсул «Фитовенол» / Л. В. Яковлева, Ю. А. Томашевская, Л. В. Гладкова // Кубанский научный медицинский вестник. – 2012. – №4 (133). – С. 184-188.

193. Яцюк, В. Я. Элементный состав некоторых видов сырья *Aesculus hippocastanum* L. / В. Я. Яцюк, О. А. Елецкая // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2017. – № 26(275). – С. 158-167.

194. A morphological phylogenetic analysis of *Aesculus* L. and *Billia* Peyr. (*Sapindaceae*) / F. Forest, J. N. Drouin, R. Charest [et all.] // Canadian Journal of Botany. – 2001. – Vol. 79, № 2. – P. 154–169.

195. *Aesculus hippocastanum* extract and the main bioactive constituent β-escin as antivirals agents against coronaviruses, including SARS-CoV2 / F. A. Peñaranda

Figueredo, J. Vicente, A. A. Barquero, C. A. Bueno // Sci. Rep. – 2024. – Vol. 14, № 1. – 6418.

196. *Aesculus hippocastanum* L. – Текст : электронный // Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений : [сайт]. – URL: https://www.plantarium.ru/page/view/item/868.html (дата обращения: 02.08.2023).

197. *Aesculus hippocastanum* L. Extract Does Not Induce Fibroblast to Myofibroblast Conversion but Increases Extracellular Matrix Production *In Vitro* Leading to Increased Wound Tensile Strength in Rats / I. Kováč, N. Melegová, M. Čoma [et all.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25, № 8. – P. 1917.

198. *Aesculus hippocastanum* L. seed extract shows virucidal and antiviral activities against respiratory syncytial virus (RSV) and reduces lung inflammation in vivo / F. M. Salinas, L. Vázquez, M. V. Gentilini [et all.] //Antiviral Res. – 2019. – Vol. 164. – P. 1- 11.

199. Ameliorative Effects of Escin on Inflammation via Glucocorticoid Receptor (GR) in Atopic Dermatitis (AD) Mouse Model / A. Y. Park, J. O. Lee, Y. N. Jang [et all.] // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2025. – Vol. 35. – e2410025.

200. An improved method for thin layer chromatographic analysis of saponins // Om Sharma, N. Kumar, B. Singh, T. N Bhat // Food Chemistry. – 2012. – Vol. 132, № 1. – P. 671-674.

201. Antiproliferative and antiangiogenic properties of horse chestnut extract / G. Mojžišová, J. Mojžiš, M. Pilátová [et all.] // Phytotherapy research. – 2013. – Vol. 27, № 2. – P. 159-165.

202. Application of high-performance liquid-ion trap mass spectrometry in analyzing saponins in sodium aescinate / Xiao-Hong Song, Wei-Hao Wang, Shi-Tao Chen // China Journal of Chinese Materia Medica. – 2016. – Vol. 41, № 13. – P. 2449-2454.

203. Bielanski, T. Horse-chestnut seed extract for chronic venous insufficiency / T. Bielanski, Z. Piotrowski // J Fam Pract. – 1999. – Vol. 48, № 3. – P. 171-172.

204. Bioactive triterpenoid saponins and phenolic compounds against glioma cells / X. Ye, S. Yu, Y. Liang [et all.] // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. – 2014. – Vol. 24, № 22. – P. 5157-5163.

205. Bioactivity Potential of *Aesculus hippocastanum* L. Flower: Phytochemical Profile, Antiradical Capacity and Protective Effects on Human Plasma Components under Oxidative Nitrative Stress *In Vitro* / A. Owczarek, J. Kołodziejczyk-Czepas, P. Marczuk [et all.] // Pharmaceuticals. 2021. Vol. 14, № 12. – P. 1301.

206. Biological activity of *Aesculus hippocastanum* flower extracts on vascular endothelial cells cultured *in vitro* / M. Dudek-Makuch, E. Studzińska-Sroka, K. Korybalska [et all.] // Phytochemistry Letters. – 2019. – Vol. 30. – P. 367-375.

207. Campelo, M. P. First Report of Horse Chestnut Powdery Mildew Caused by Erysiphe flexuosa in Castilla y León, Spain / M. P. Campelo, A. Lorenzana, M. F. Marcos // Plant Disease. – 2007. – Vol. 91, № 11. – P. 1513.

208. Castanea. Текст : электронный // Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений : [сайт]. – URL: https://www.plantarium.ru/page/view/item/43784.html (дата обращения: 02.08.2023).

209. Changes in *Aesculus hippocastanum* leaves during feeding of *Cameraria ohridella*: anatomical and histochemical analyses / A. Konarska, M. Grochowska, W. Haratym [et all.] // Urban Forestry & Urban Greening. – 2020. – Vol. 56. – P. 1–18.

210. Chwil, M. Micromorphology of trichomes in the flowers of the horse chestnut *Aesculus hippocastanum* L. / E. Weryszko-Chmielewska, A. Sulborska, M. Michońsk // Acta Agrobotanica. – 2014. Vol. 66, №. 4. – P. 45-54.

211. Çiftçi, G. A. Escin reduces cell proliferation and induces apoptosis on glioma and lung adenocarcinoma cell lines / G. A. Çiftçi, A. Işcan, M. Kutlu // Cytotechnology. – 2015. – Vol. 67, № 5. – P. 893-904.

212. Comparative Metabolomics of Reproductive Organs in the Genus *Aesculus* (*Sapindaceae*) Reveals That Immature Fruits Are a Key Organ of Procyanidin Accumulation and Bioactivity / A. Green, G. F. Padilla-Gonzalez, M. Phumthum [et all.] // Plants. – 2021. – Vol. 10, № 12. – P. 2695.

213. Comparison of Analytical Methods Used for Standardization of Triterpenoid Saponins in Herbal Monographs Included in the Russian and Other Pharmacopeias / L. N. Frolova, E. L. Kovaleva, V. V. Shelestova [et all] // Phytochemical analysis. – 2025. – Vol. 36, № 8. – P. 2401–2416.

214. Costantini, A. Escin in pharmaceutical oral dosage forms: quantitative densitometric HPTLC determination / A. Costantini // Farmaco. – 1999. – Vol. 54, № 11-12. – P. 728-732.

215. Cytotoxic effects of four aescin types on human colon adenocarcinoma cell lines / E. Seweryn, M. Gleńsk, K. Sroda-Pomianek [et all.] // Natural Product Communications. – 2014. – Vol. 9, № 3. – P. 387-390.

216. Densitometric thin-layer chromatographic determination of aescin in a herbal medicinal product containing *Aesculus* and *Vitis* dry extracts / S. Apers, T. Naessens, L. Pieters, A. Vlietinck // Journal of chromatography. A. – 2006. – Vol. 1112, № 1-2. – P. 165-170.

217. Determination of Four Major Saponins in Skin and Endosperm of Seeds of Horse Chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) Using High Performance Liquid Chromatography with Positive Confirmation by Thin Layer Chromatography / Zead Helmi Mahmoud Abudayeh, Khaldun Mohammad Al Azzam, Ahmad Naddaf [et all.] // Advanced Pharmaceutical Bulletin. – 2015. – Vol. 5, № 4. – P. 587-591.

218. Determination of four major saponins in the seeds of *Aesculus chinensis* Bunge using accelerated solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography and electrospray-time of flight mass spectrometry / J. Chen, W. Li, B. Yang [et all.] // Anal Chim Acta. – 2007. – Vol. 596, № 2. – P. 273-280.

219. Dudek-Makuch, M. Coumarins in horse chestnut flowers: isolation and quantification by UPLC method // M. Dudek-Makuch, I. Matławska // Acta poloniae pharmaceutica. – 2013. – Vol. 70. – P. 517-22.

220. Dudek-Makuch, M. Flavonoids from The Flowers of *Aesculus hippocastanum* / M. Dudek-Makuch, I. Matlawska // Acta poloniae pharmaceutica. – 2011. – Vol. 68, № 3. – P. 403-408.

221. Effect of Horse-chestnut seed extract on matrix metalloproteinase-1 and - 9 during diabetic wound healing / H. Aksoy, Ö. Çevik, A. Şen [et all.] // Journal of Food Biochemistry. – 2019. – Vol. 43, № 3. – e12758.

222. Efficacy, routine effectiveness, and safety of horsechestnut seed extract in the treatment of chronic venous insufficiency. A meta-analysis of randomized controlled trials and large observational studies / U. Siebert, M. Brach, G. Sroczynski, K. Berla // Int Angiol. – 2002. – Vol. 21, № 4. – P. 305-315.

223. Environmental and Genetic Factors Involved in Plant Protection-Associated Secondary Metabolite Biosynthesis Pathways / X. Zhan, Z. Chen, R. Chen, C. Shen // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol. 13. – 877304.

224. Escin augments the efficacy of gemcitabine through down-regulation of nuclear factor-κB and nuclear factor-κB-regulated gene products in pancreatic cancer both *in vitro* and *in vivo* / Y. W. Wang, S. J. Wang, Y. N. Zhou [et all.] // J. Cancer. Res. Clin. Oncol. – 2012. – Vol. 138, № 5. – P. 785- 797.

225. Escin Ia suppresses the metastasis of triple-negative breast cancer by inhibiting epithelial mesenchymal transition via down-regulating LOXL2 expression / Y. Wang, X. Xu, P. Zhao [et all.] // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7, №17. – P. 23684-23699.

226. Escin induces caspase-dependent apoptosis and autophagy through the ROS/p38 MAPK signalling pathway in human osteosarcoma cells *in vitro* and in vivo / J. Zhu, W. Yu, B. Liu [et all.] // Cell Death and Disease. – 2017. – Vol. 8, № 10. – e3113.

227. Gallelli, L. Escin: a review of its anti-edematous, antiinflammatory, and venotonic properties / L. Gallelli // Drug Design Development and Therapy. – 2019 – Vol. 13 – P. 3425-3437.

228. Geisler, R. The Biosurfactant β-Aescin: A Review on the Physico-Chemical Properties and Its Interaction with Lipid Model Membranes and Langmuir Monolayers / R. Geisler, C. Dargel, T. Hellweg // Molecules. – 2019. – Vol. 25, № 1. – P. 117.

229. Gocan, S. Automated multiple development thin layer chromatography of some plant extracts / S. Gocan, G. Cimpan, L. Muresan // J Pharm Biomed Anal. – 1996. – Vol. 14, № 8-10. – P. 1221-1227.

230. GRIN Genera of *Sapindaceae* subfam. *Hippocastanoideae*. Текст : электронный // GRIN Taxonomy for Plants : [сайт]. – URL: http://www.ars-grin.gov.4/cgi-bin/npgs/html/gnlist.pl?2226 (дата обращения 12.08.2023).

231. Güney, G. The apoptotic effects of escin in the H-Ras transformed 5RP7 cell line / G. Güney, H. M. Kutlu, A. Işcan // Phytotherapy research. – 2013. – Vol. 27, № 6. – P. 900-905.

232. Harris, A. Estimating ancestral distributions of lineages with uncertain sister groups: a statistical approach to Dispersal-Vicariance Analysis and a case using *Aesculus* L. (*Sapindaceae*) including fossils / A. Harris, Q.-Y. Xiang // Journal of Systematics and Evolution. – 2009. – Vol. 47, № 5 – P. 349–368.

233. Harris, A. Phylogeny, origin, and biogeographic history of *Aesculus* L. (*Sapindales*) - an update from combined analysis of DNA sequences, morphology, and fossils / A. Harris, Q.-Y. Xiang, D. T. Thomas // Taxon. – 2009. – Vol. 58, № 1. – P. 108–126.

234. Herbal haemorrhoidal cream for haemorrhoids / E. Gurel, S. Ustunova, B. Ergin [et all.] // Chin J Physiol. – 2013. – Vol. 56, № 5. – P. 253-262.

235. Histological examination of horse chestnut infection by *Pseudomonas syringae pv. aesculi* and non-destructive heat treatment to stop disease progression / J. de Keijzer, L. A. van den Broek, T. Ketelaar, A. A. van Lammeren // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 7. – e39604.

236. Horse Chestnut Saponins-Escins, Isoescins, Transescins, and Desacylescins / P. Savarino, E. Colson, J. André, P. Gerbaux // Molecules. – 2023. Vol. 28, № 5. – 2087.

237. Idris, S. Phytochemical, ethanomedicinal and pharmacological applications of escin from *Aesculus hippocastanum* L. towards future medicine / S. Idris, A. Mishra, M. Khushtar // Journal of basic and clinical physiology and pharmacology. – 2020. – 31, № 5.

238. *In vitro* anticancer potential of tree extracts from the Walloon Region forest / M. Frédérich, A. Marcowycz, E. Cieckiewicz [et all.] // Planta Medica. – 2009. – Vol. 75, № 15. – P. 1634-1637.

239. Inhibition of Migration and Invasion in Melanoma Cells by β-Escin via the ERK/NF-κB Signaling Pathway / H. Kwak, H. An, M. B. Alam [et all.] //Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2018. – Vol. 41, № 10. – P. 1606-1610.

240. Isah, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production / T. Isah // Biological Research. – 2019. – Vol. 52, № 1. – P. 39.

241. ITIS Standard Report Page: Fagaceae. Текст : электронный // Integrated Taxonomic Information System - Search Results : [сайт]. – URL: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19275 (дата обращения 12.08.2023).

242. Jagroop, I. A. Plant extracts inhibit ADP-induced platelet activation in humans: their potential therapeutic role as ADP antagonists / I. A. Jagroop // Purinergic. Signal. – 2014. – Vol. 10, № 2. – P. 233-239.

243. Keszthelyi, S. Impact analysis of different applications of cyantraniliprole on control of horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*) larvae supported by biophoton emission / S. Keszthelyi, B. Gerbovits, I. Jócsák // Biologia Futura. – 2023. – Vol. 74, № 1-2. – P. 209-219.

244. Kukula-Koch, W. Influence of extrahent on antioxidant capacity of *Aesculus hippocastanum* seeds / W. Kukula-Koch, B. Kędzierski, K. Głowniak // Natural product research. – 2015. – Vol. 29, № 4. – P. 370-373.

245. Methlie, C. B. Horse chestnut--remedy for chronic venous insufficiency / C. B. Methlie, J. Schjøtt //Tidsskrift for den Norske Laegeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke. – 2009. – Vol. 129, № 5. – P. 420-422.

246. Michelini, F. M. Virucidal, antiviral and immunomodulatory activities of β-escin and *Aesculus hippocastanum* extract / F. M. Michelini, L. E. Alché, C. A. Bueno // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2018. – Vol. 70, № 11. – P. 1561-1571.

247. Molecular targets and anti-cancer potential of escin / D. H. J. Cheong, F. Arfuso, G. Sethi [et all.] // Cancer Letters. – 2018. – Vol. 422. – P. 1-8.

248. Morimoto, S. Tannins and related compounds. LIX. Aesculitannins, novel proanthocyanidins with doubly-bonded structures from *Aesculus hippocastanum* L. / S. Morimoto, G. I. Nonaka, I. Nishioka // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 1987. – Vol. 35, № 12. – P. 4717-4729.

249. Network Pharmacology Based Research on the Combination Mechanism Between Escin and Low Dose Glucocorticoids in Anti-rheumatoid Arthritis / L. Zhang, Y. Huang, C. Wu [et all.] // Frontiers in Pharmacology. – 2019. – Vol. 10. – P. 280.

250. Oleszek, W. A. Chromatographic determination of plant saponins / W. A. Oleszek // Journal of chromatography. A. – 2002. – Vol. 967, № 1. – P. 147-162.

251. Origin and biogeography of *Aesculus* L. (*Hippocastanaceae*): a molecular phylogenetic perspective / Q. Y. Xiang, D. J. Crawford, A. D. Wolfe [et all.] // Evolution. – 1998. – Vol. 52, № 4. – P. 988-997.

252. PASS online. Текст : электронный // Way2Drug Predictive services : [сайт]. – URL: http://way2drug.com/passonline/ (дата обращения: 30.01.2021).

253. Perspectives for the biological control of *Cameraria ohridella* / R. Zemek, E. Prenerová, L. Volter [et all.] // Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. – 2007. – Vol. 72, № 3. – P. 521-526.

254. Phenolic-Based Discrimination between Non-Symptomatic and Symptomatic Leaves of *Aesculus hippocastanum* Infested by *Cameraria ohridella* and *Erysiphe flexuosa* / A. Hanaka, S. Dresler, W. Mułenko [et all.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, № 18. – 14071.

255. Phlebotonics for venous insufficiency / M. J. Martinez-Zapata, R. W. Vernooij, S. M. Uriona Tuma [et all.] // Cochrane database of systematic reviews. – 2020. – Vol. 11. – CD003229.

256. Pittler, M. Horse-chestnut seed extract for chronic venous insufficiency / M. Pittler, E. Ernst // Arch Dermatol. – 1998. – Vol. 134, № 11. – P. 1356-1360.

257. Potential Activity Mechanisms of *Aesculus hippocastanum* Bark: Antioxidant Effects in Chemical and Biological *In Vitro* Models / A. Owczarek, J. Kolodziejczyk-Czepas, J. Woźniak-Serwata [et all.] //Antioxidants. – 2021. – Vol. 10, № 7. – P. 995.

258. Quantitative determination of ginsenosides from *Panax ginseng* roots and ginseng preparations by thin layer chromatography—densitometry / J. Corthout, T. Naessens, S. Apers, A. J. Vlietinck // J Pharm Biomed Anal. – 1999. – Vol. 21, № 1. – P. 187-192.

259. Quickly find chemical information. – Текст : электронный // PubChem : [сайт]. – URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ (дата обращения: 18.07.2026).

260. Ramakrishna, A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants / A. Ramakrishna, G. Ravishankar // Plant signaling and behavior. – 2011. – Vol. 6, № 11. – P. 1720-1731.

261. Red Horse Chestnut and Horse Chestnut Flowers and Leaves: A Potential and Powerful Source of Polyphenols with High Antioxidant Capacity / A. Bielarska, J. Jasek, R. Kazimierczak, E. Hallmann // Molecules. – 2022. – Vol. 27, № 7. – P. 2279.

262. Role of Promising Secondary Metabolites to Confer Resistance Against Environmental Stresses in Crop Plants: Current Scenario and Future Perspectives / D. Chen, B. Mubeen, A. Hasnain [et all.] // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol. 13. – 881032.

263. Santos-Buelga, C. Procyanidin trimers possessing a doubly linked structure from *Aesculus hippocastanum* / C. Santos-Buelga, H. Kolodziej, D. Treutter // Phytochemistry. – 1995. – Vol. 38. – P. 499–504.

264. SciFinder. – Текст : электронный // CAS : [сайт]. – URL: https://scifinder-n.cas.org/ (дата обращения: 18.07.2026).

265. Sustainable Extraction and Characterisation of Bioactive Compounds from Horse Chestnut Seed Coats for the Development of Bio-Based Additives / T. Havelt, S. Havelt, X. T. Do [et all.] // Resources. – 2019. – Vol. 8, № 2. – P. 114.

266. TLC-densitometric analysis of α-escin in bulk drug substance and in pharmaceutical dosage forms / M. Dołowy, A. Pyka-Pająk, F. Katarzyna, J. Zagrodzka // Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. – 2015. – Vol. 28, №3. – P. 186 - 191.

267. Tracing back the history of introducing horse-chestnut in Europe / Ł. Walas, K. Sękiewicz, P. Ganatsas [et all.] // Urban Forestry & Urban Greening. – 2025. – Vol. 105. – 128715.

268. Vanhaelen, M. Quantitative determination of biologically active constituents in medicinal plant crude extracts by thin-layer chromatography—densitometry / M. Vanhaelen, R. Vanhaelen-Fastre // Journal of Chromatography. A. – 1983. – Vol. 281. – P. 263-271.

269. Vejselova Sezer, C. Escin induces cell death in human skin melanoma cells through apoptotic mechanisms / C. Vejselova Sezer // Toxicology Research. – 2024. – Vol. 13, № 4. – tfae124.

270. Weryszko-Chmielewska, E. Leaf micromorphology of *Aesculus hippocastanum* L. and damage caused by leaf-mining larvae of *Cameraria ohridella* Deschka and Dimić / E. Weryszko-Chmielewska, W. Haratym // Acta Agrobotanica. – 2012. – Vol. 65, № 1. – P. 33–44.

271. Weryszko-Chmielewska, E. Micromorphology of the floral nectary of red horse chestnut (Aesculus × carnea Hayne) / E. Weryszko-Chmielewska, M. Chwil // Modern Phytomorphology. – 2014. – Vol. 6, № 49.

272. Weryszko-Chmielewska, E. Structure of floral nectaries in *Aesculus hippocastanum* L. / E. Weryszko-Chmielewska, M. Chwil // Acta Botanica Croatica. – 2017. – Vol. 76, № 1. – P. 41-48.

273. Yu, Z. Effect of beta-aescin extract from Chinese buckeye seed on chronic venous insufficiency / Z. Yu, P. Su // Pharmazie. – 2013. – Vol. 68, № 6. – P. 428- 430.

274. Zhang, Z. An overview of Genus *Aesculus* L.: ethnobotany, phytochemistry, and pharmacological activities / Z. Zhang, S. Li, X. Yuan // Pharmaceutical Crops. – 2010. – Vol. 1, № 1. – P. 24–51.

275. β-Escin: An Updated Review of Its Analysis, Pharmacology, Pharmacokinetics, and Toxicity / Y. Wang, X. Han, X. Wan [et all.] // Am. J. Chin. Med. – 2023. – Vol. 51, № 8. – P. 2095-2120.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»)

Университетская пл., 1, Воронеж, 394018.
Тел. (473) 220-75-21. Факс (473) 220-87-55.
E-mail: office@main.vsu.ru
http://www.vsu.ru
ОКПО 02068120, ОГРН 1023601560510
ИНН/КПП 3666029505/366601001

12.05.2026 № 1500-105
На № _____ от ____.____.20____

И.о. генерального директора
ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России
кандидату фармацевтических наук
Косенко Валентине Владимировне

Фармацевтический факультет Воронежского государственного университета направляет для рассмотрения проект ФС «Конского каштана обыкновенного цветки», разработанный сотрудниками кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии в рамках выполнения диссертационной работы асп. Дунилина А.Д.

Декан фармацевтического факультета
ФГБОУ ВО ВГУ
д.фарм.н., профессор Е.Е. Чупандина

КАНЦЕЛЯРИЯ
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России
21. 05. 2026
Вх. № 04072

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Конского каштана обыкновенного цветки	ФС
Aesculi hippocastani flores	Вводится впервые

Заготовленные в период массового цветения (май–июнь) и высушенные соцветия (цветки), дикорастущего или культивируемого дерева конского каштана обыкновенного – *Aesculus hippocastanum* L., сем. конскокаштановые – *Hippocastanaceae*.

Содержит не менее 2 % суммы флавоноидов в пересчете рутин; не менее 1 % суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин; не менее 25 % экстрактивных веществ, извлекаемых 70 % спиртом этиловым, в сухом сырье.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Внешние признаки. Определение проводят в соответствии с ОФС «Цветки».

Цельное сырье. Сырьё представляет собой отдельные цветки и их части, отделенные от общей оси соцветия. Цветки имеют неправильное строение. Чашечка зеленоватого или зеленовато-коричневого цвета, состоит из 5 сросшихся у основания чашелистиков. Венчик беловато-розового или буроватого цвета, имеет 5 лепестков, один из которых незначительных размеров или может отсутствовать. Размер цветков 0,5 – 2,0 см. Тычиночные нити длинные, выходят за пределы венчика.

Запах слабый, специфический.

Измельченное сырье. Смесь кусочков цветков и их частей, отделенных от общей оси соцветия, кусочков чашечки зеленоватого или зеленовато-

Приложение 2

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Ботанический сад им. профессора Б.М. Козо-Полянского ВГУ

Утверждаю
Директор ботанического сада ВГУ
к.с.-х. наук, доцент
_____ Воронин А.А.
«22» 07 2025 г.

ИНСТРУКЦИЯ
ПО СБОРУ И СУШКЕ КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО ЦВЕТКОВ

Согласовано: ведущий биолог
ботанического сада _____ Комова А.В.

Воронеж – 2025

Приложение 3

Патент РФ на изобретение RU 2862904 C1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 862 904** (13) **C1**

(51) МПК
G01N 33/52 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
G01N 33/52 (2026.01)

(21)(22) Заявка: **2025123445, 25.08.2025**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.08.2025

Дата регистрации:
26.05.2026

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **25.08.2025**

(45) Опубликовано: **26.05.2026** Бюл. № **15**

Адрес для переписки:
394018, г. Воронеж, Университетская пл., 1, ФГБОУ ВО "ВГУ", ОЗИС

(72) Автор(ы):
Тринеева Ольга Валерьевна (RU),
Дунилин Александр Денисович (RU),
Гудкова Алевтина Алексеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Воронежский государственный университет" (ФГБОУ ВО "ВГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2170930 C1, 20.07.2001. RAO GG. Titrimetric determination of ascorbic acid with cerium (IV) sulphate //Anal. Chim. Acta, 56 (1971), 325-328. КАРАНДИ И.В. и др. Использование цериметрического метода для определения фенольного гидроксила в аналитической практике //"Заводская лаборатория. Диагностика материалов", 2020, т.86, N5, стр.11-15.** (см. прод.)

RU 2862904 C1

RU 2862904 C1

(54) **Способ определения антиокислительной активности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов методом обратной цериметрии**

(57) Реферат:

Изобретение относится к аналитической химии, химико-фармацевтической промышленности, а именно к способу определения антиокислительной активности извлечений из лекарственного растительного сырья (ЛРС) или лекарственных растительных препаратов (ЛРП). Способ определения антиокислительной активности извлечений из лекарственного растительного сырья или лекарственных растительных препаратов методом обратной цериметрии, включающий определение содержание антиокислительной активности и суммарного содержания биологически активных веществ - антиокислителей (БАВ-АО) путем окислительно-восстановительного титрования водных извлечений из лекарственного растительного сырья, согласно которому навеску высушенного измельченного лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, проходящего через сито с размером отверстий 0,5-1 мм, помещают в коническую колбу, заливают водой очищенной в массо-объемном соотношении - на 1 г высушенного сырья используют 10 мл воды очищенной, при этом общий объем воды очищенной для сырья определяют с учетом коэффициента водопоглощения лекарственного растительного сырья или лекарственного растительного препарата, кипятят на водяной бане с обратным холодильником при температуре кипения водяной бани и при периодическом перемешивании в течение 15 минут, с последующим настаиванием при комнатной температуре в течение 45 минут

Приложение 4

Акты внедрения

РЕКОМЕНДОВАНО:
Учебно-методической комиссией
Протокол № 3 от 26.11. 2025 г.
Руководитель секции УМК
по направлению «Лесное дело»
д.с.-х.н., проф. _____ Трещевская Э.И.

УТВЕРЖДАЮ:
Проректор по учебной
работе ВГЛТУ
_____ Черных А.С.

Акт

О внедрении в учебный процесс по направлению подготовки 35.03.01 Лесное дело, профиль – Защита леса и охотоведение результатов диссертации А.Д. Дунилина «Сравнительное фармакогностическое изучение цветков каштана конского различных регионов произрастания».

1. Автор: Дунилин Александр Денисович.

2. Краткое описание результатов внедрения, конечный результат.

Предметом внедрения в учебный процесс являются результаты изучения морфолого-анатомических характеристик каштана конского обыкновенного цветков, а также вариабельности его химического состава в зависимости от региона произрастания, что позволит углубить знания обучающихся как в определении видовой принадлежности конского каштана обыкновенного, так и о влиянии климатических факторов на накопление биологически активных веществ в цветках данного растения.

3. Внедрение по дисциплине «Лекарственные растения».

4. Влияние на качество подготовки бакалавров.

Внедряемые результаты способствуют формированию профессиональных компетенций, повышают уровень учебного процесса и качество подготовки бакалавров по направлению подготовки 35.03.01 Лесное дело, профиль – Защита леса и охотоведение.

Зав. выпускающей кафедрой экологии
защиты леса и лесного охотоведения
д.б.н., профессор _____ Харченко Н.Н.

«УТВЕРЖДАЮ»
Декан фармацевтического факультета
ФГБОУ ВО «Воронежский госуниверситет»,
д.фарм.н., профессор
Чупандина Е.Е.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ № 1300-11

г. Воронеж 26 января 2026 года

1. Наименование для предложения:
Материалы диссертационного исследования «Сравнительное фармакогностическое изучение цветков каштана конского различных регионов произрастания».

2. Кем предложен, адрес исполнителя:
Аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Дунилин А.Д.

3. Где и когда внедрено:
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», фармацевтический факультет.

4. Эффективность внедрения:
Предлагаемое внедрение используется при проведении занятий на курсах повышения квалификации провизоров и фармацевтов по ДПО «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» по тематике фармакогностического анализа и проблем идентификации нефармакопейных морфологических частей фармакопейных видов лекарственных растений, произрастающих на территории Центрального Черноземья.

К.фарм.н., доцент кафедры
фармацевтической химии и фармакогнозии
фармацевтического факультета ВГУ Карлов П.М.

К.фарм.н., доцент кафедры
управления и экономики фармации
фармацевтического факультета ВГУ Колосова О.А.

«УТВЕРЖДАЮ»
Заведующий кафедрой фармацевтической химии и
фармакогнозии фармацевтического факультета
ФГБОУ ВО «Воронежский госуниверситет»,
д.фарм.н., профессор
Тринеева О.В.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ № 1506-89

г. Воронеж 26 января 2026 г

1. Наименование для предложения:
Материалы диссертационного исследования «Сравнительное фармакогностическое изучение цветков каштана конского различных регионов произрастания».
2. Кем предложен, адрес исполнителя:
Аспирант кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Дунилин А.Д.
3. Где и когда внедрено:
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», фармацевтический факультет, кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии.
4. Эффективность внедрения:
Внедряемые материалы будут использованы для проведения учебных занятий при реализации дисциплины «Фармакогнозия» и учебной практики по фармакогнозии для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация» (ВО); дисциплины «Фармакогнозия» и производственной практики по фармакогнозии для ординаторов, обучающихся по специальности 33.08.03 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия», а также при реализации МДК «Лекарственные растительные препараты» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 «Фармация» (СПО). Предлагаемое внедрение полезно также при проведении научно-исследовательских работ по стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья.

Д.фарм.н., доцент кафедры
фармацевтической химии и фармакогнозии
фармацевтического факультета ВГУ Гудкова А. А.

К.фарм.н., доцент кафедры
фармацевтической химии и фармакогнозии
фармацевтического факультета ВГУ Чистякова А.С.

Приложение 5

Таблица 1 – Сводные данные по составу БАВ в сырье каштана конского

Группа БАВ	Морфологические группы сырья каштана конского					
	Семена [3, 66, 68, 95 213, 236]	Плоды [11, 73, 77, 156, 192, 213]	Листья [146, 213]	Цветки [37, 50, 53, 96,140, 146, 149, 213]	Почки [95]	Кора [11, 16, 61, 213]
1	2	3	4	5	6	7
Тритерпеновые сапонины	Эсцин (α-эсцин, β-эсцин и криптоэсцин и их агликоны эсцигенин, протоэсцигенин, баринтогенины C и D). До 13%	+	До 2,5%	До 5%	+	-
Флавоноиды	Не превышает долей процента (гликозиды кверцетина и кемпферола: кверцитрин, изокверцитрин и др.)	До 0,13% флавоноидных гликозидов	До 2% (кемпферол, кверцетин, лютеолин-7-гликозид, гиперозид, кверцитрин, изокверцитрин, рутин, кемпферол-3-глюкозид и родственные им соединения	До 2% (кверцетин, кемпферол, рутин)	Рамноцитрин и 7,4′-диметилкемпферол	Кверцетин и его производные
Дубильные вещества	Конденсированной группы (проантоцианидины, эпикатехин и их димеры)	Около 0,9% (катехиновой природы)	До 10% (эпикатехин галлат, галловая кислота)	До 7% (эпикатехин)	-	Конденсированного типа (эпикатехин и процианидин A_2)
Жирное масло	4,13-8,0%	5-7%	-	-	-	2,5-7%

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
Полисахариды (пектины и крахмал)	До 13%	Крахмала до 40–50 % (галактоза и арабиноза с примесью глюкозы, ксилозы, маннозы, рамнозы и рибозы)	Полисахариды до 2%; пектины до 0,4%	Полисахариды до 3%	-	До 9%
Жирные кислоты	31 жирная кислота: олеиновая, линолевая и пальмитиновая кислоты капроновая, каприловая, миристиновая, пентадекановая, пальмитиновая, маргариновая, стеариновая, арахиновая, элаидиновая, эруковая, гексадеценовая, линоленовая	миристиновая, лауриновая, пальмитиновая, олеиновая и арахидоновая кислоты	-	-	-	+
Аминокислоты	14 аминокислот аргинин, лизин, тирозин, фенилаланин, гистидин, лейцин, изолейцин, пролин, валин, метионин, треонин, серин, аланин, глицин	+	+	+	+	+
Кумарины, оксикумарины	+	+	-	Скополетин до 0,4%, эскулетин до 0,13 и фраксетин до 0,05%	-	эскулин и эскулетин, фраксин, фраксетин и скополетин
Органические кислоты	-	-	До 2%	До 5%	-	-

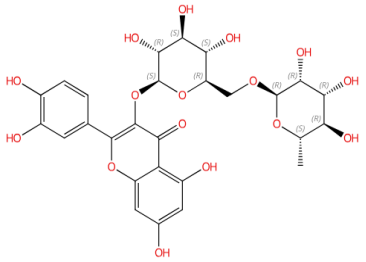
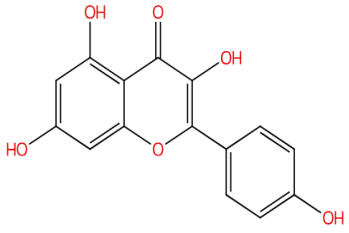
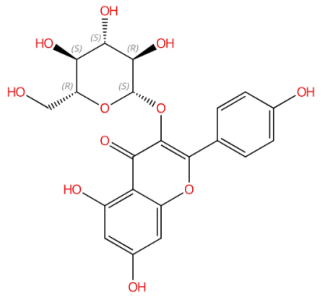
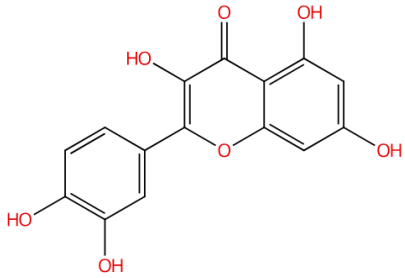
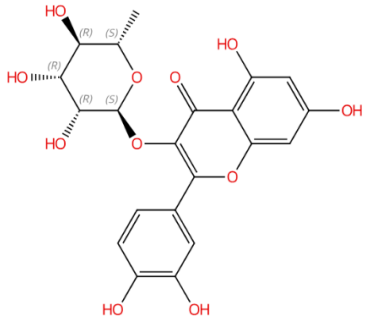
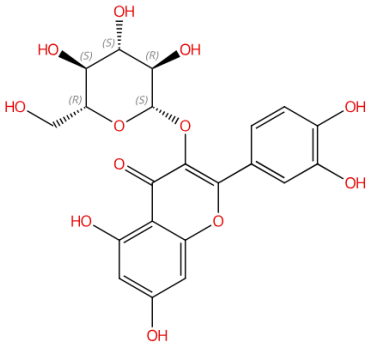
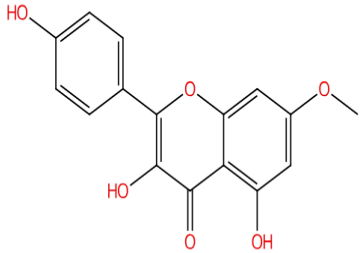
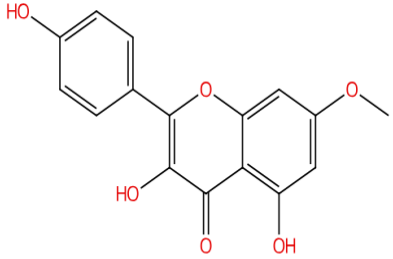
Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7
Каротиноиды	-	-	До 2% (лютеин, виолаксантин)	До 0,1%	-	-
Фенолокислоты	-	-	Хлорогеновая и кофейная кислоты	-	-	-
Фитостеролы	-	-	-	β-ситостерол	-	β-ситостерол, стигмастерол

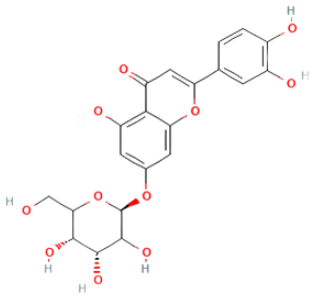
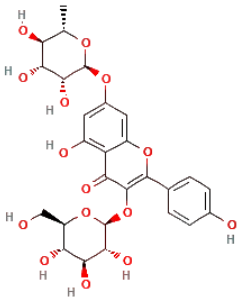
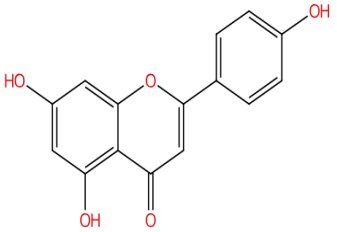
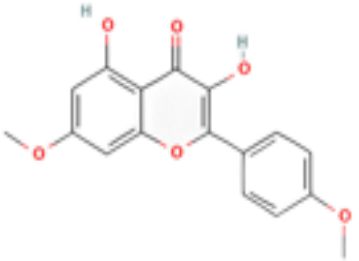
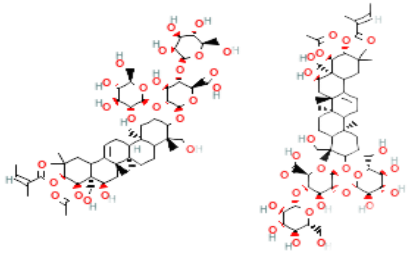
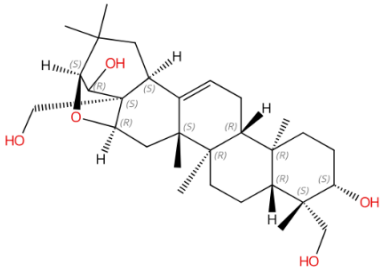
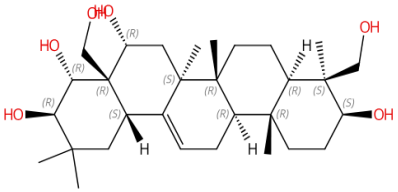
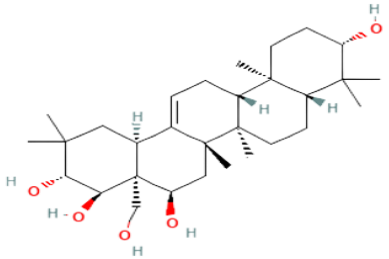
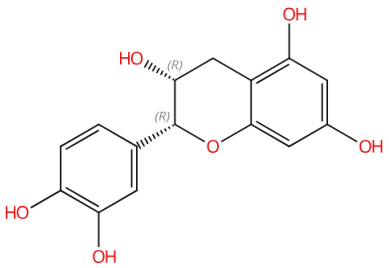
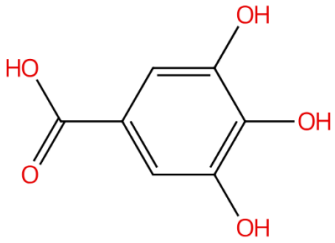
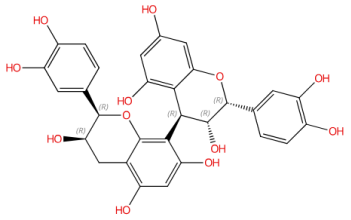
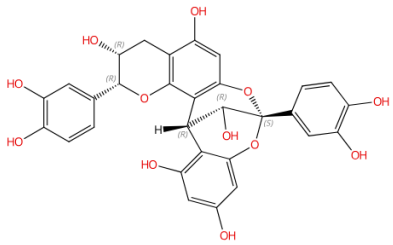
«-» нет данных или отсутствуют

Приложение 6

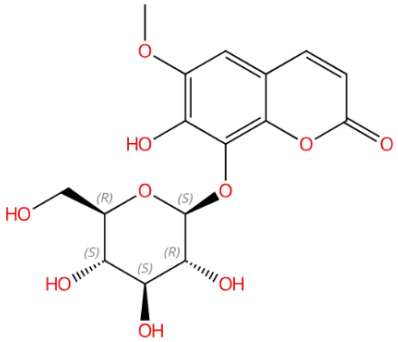
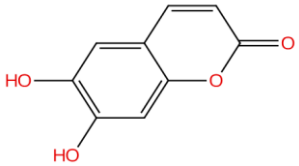
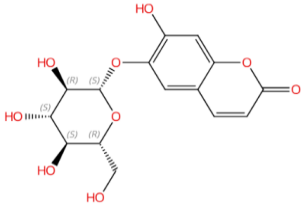
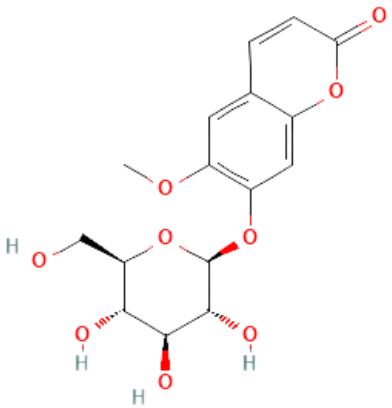
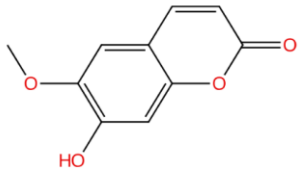
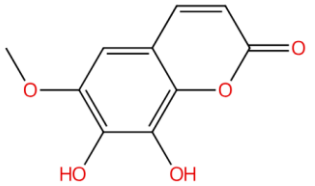
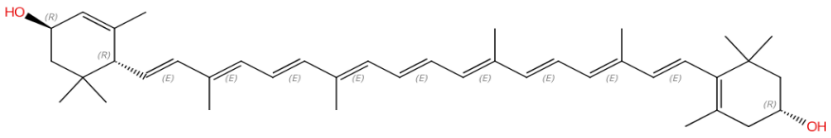
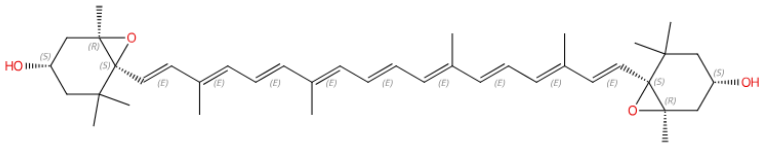
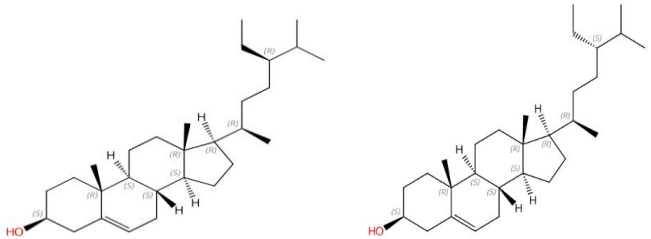
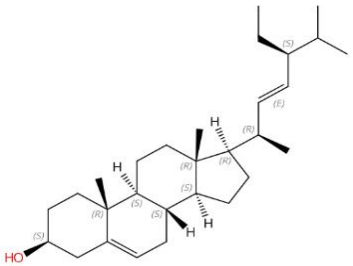
Таблица 1 – Структурные формулы ключевых вторичных метаболитов каштана конского обыкновенного [3, 11, 16, 37, 50, 53, 61, 66, 67, 73, 77, 95, 96, 140, 146, 149, 156, 192, 213, 259, 264]

Группа БАВ	Наименование метаболита			
1	2	3	4	5
Флавоноиды	 Рутин ○; ◊; ♦; □	 Кемпферол ○; ◊; ♦; □	 Кемпферол-3-глюкозид (астрагалин) ◊; □	 Кверцетин ○; ◊; ♦; □; ■
	 Кверцитрин ○;◊; ♦; □	 Изокверцитрин ○; ◊; ♦; □	 Гиперозид ○; ◊; □	 Рамноцитрин ♦

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
	 Лютеолин-7-О-гликозид ◊	 Кемпферол-3-О-β-глюкопиранозид □	 Апигенин □	 7,4′-диметилкемпферол ♦
Тритерпеновые сапонины	 α-; β-Эсцин ○; ●; ◊; ♦; □	 Эсцигенин ●	 Протоэсцигенин ●	 Баринтогенин С ●
Дубильные вещества и конденсированные дубильные вещества	 Эпикатехин ○; ●; ◊; □; ■	 Галловая кислота ◊	 Процианидин B_2 (присутствуют также изомеры B_1 и B_3) ●; □; ■	 Процианидин A_2 ■

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5
Кумарины, оксикумарины	 Фраксин ○; ●; ■	 Эскулетин ○; ●; □; ■	 Эскулин ○; ●; ■	 Скополин ●; ■
		 Скополетин ●; □; ■	 Фраксетин ○; ●; □; ■	
Каротиноиды	 Лютеин ◊; □		 Виолаксантин ◊; □	
Фитостеролы	 β-; γ-ситостерол □; ■		 Стигмастерол □; ■	

Морфологические группы сырья, содержащие указанный метаболит: ● - семена; ○ - плоды; ◊ - листья; ♦ - почки; □ – цветки; ■ - кора

Приложение 7

Таблица 1 – Основные качественные реакции и пробы, используемые для обнаружения ТС в растительном сырье

№ п/п	Реакция/проба	Аналитический эффект	Ссылка
1	Порошок солодки с 0,05 мл серной кислоты	Частицы порошка станут оранжево-желтыми, а некоторые фрагменты изменятся более медленно на розовато-красный цвет	[180]
2	Реакция гемолиза эритроцитов (с 2%-ной взвесью бараньих эритроцитов)	Кровь становится прозрачной, ярко-красной, лаковой (эритроциты переходят в плазму)	[110, 136]
3	Реакция пенообразования	Нейтральные сапонины образуют обильную и стойкую пену в щелочной среде, но пена не стабильна в кислой среде	[17, 27, 110, 122, 123, 130, 136]
4	Осаждение средним свинца ацетатом	Желтовато-бежевый творожистый осадок	[17, 170]
5	Реакция Лафона (1 мл кислоты серной концентрированной, 1 мл спирта этилового 96% и 1 капля раствора железа сульфата 10%, затем смесь нагревали)	Коричнево-зеленый осадок	[17, 170]
6	Реакция Фонтан-Канделя (с эфирным экстрактом и серной кислотой)	Появление окрашенных (часто в малиновый, розовый или фиолетовый цвет) зон или колец указывает на наличие ТС	[17]
7	Реакция с раствором нитрита натрия 10% (1 мл раствора натрия нитрата 10% и 1 капля кислоты серной концентрированной)	Развитие бордово-красного окрашивания	[122, 170]
8	Реакция со спиртовым раствором холестерина	Бежевый или коричневатый осадок	[122]
9	Реакция Санье (с концентрированной серной кислоты и сульфатом меди при нагревании)	Окрашивание в сине-зеленый или зеленый цвет при наличии ТС	[135]
10	С раствором $Ba(OH)_2$	Выпадение осадка	[55]

Приложение 8

Таблица 1 – Условия спектрофотометрического определения сапонинов в пересчете на эсцин в ЛРС, основанное на реакции с концентрированной серной кислотой

Экстрагент	Соотношение сырье : экстрагент	Время экстракции, мин	Кратность экстракции	Очистка извлечения	Предварительный гидролиз	Соотношение экстракт :H_2SO_4	Время реакции с H_2SO_4, мин
Трава гиностеммы пятилистной [119]							
70% спирт этиловый	1:200	90	1	+	-	1:5	10
Плоды дерезы китайской [153]							
40% спирт этиловый	1:250	90	5	-	+	1:4	10
Клубнелуковицы ариземы единокровной [109]							
95% спирт этиловый подкисленный HCl конц.	1:100	60	2	+	-	1:4	20
Почки и листья черной смородины [125]							
95% спирт этиловый подкислённый HCl конц	1:100	60	2	+	-	1:4	30
Трава грыжника голого [138]							
70% спирт этиловый	1:30	90	1	+	-	1:4	30
Травы ярутки полевой [135]							
спирт этиловый 70%	1 : 100	60	1	-	-	1:2	30
Корневища с корнями синюхи [27, 86]							
1. хлороформ	1:100	60	2	+	-	1:5	60
2. 40% спирт этиловый	1:100	60	2				
70% спирт этиловый	Циркуляционная экстракция в аппарате Сокслета			-	+	1:2	60

Таблица 2 – Условия выделения и спектрофотометрического количественного определения ТС в семенах каштана конского [26]

Экстрагент	Соотношение	Время экстракции, мин	Кратность экстракции	Очистка извлечения	Предварительный гидролиз	Реагент	Время реакции, мин	λ, нм (СО)
Смесь метанол-вода (13:7)	1:100	30 мин	1	Жидко-жидкостная экстракция верхним слоем смеси хлороформ-хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М-пропанол (5:3:2)	Растворение сухого остатка после очистки в ледяной уксусной кислоте	Железа (III) хлорида раствор кислый	На водяной бане при температуре около 60°С в течение 25 мин	540 нм (β-эсцин)
0,1 М раствор хлористоводородной кислоты	0,2:10	Растворение навески	Двукратная жидко-жидкостная экстракция смесью10 мл н-пропилового спирта и 25 мл хлороформа	Растворение сухого остатка после очистки в ледяной уксусной кислоте	Конц. кислота серная и 10% раствор ванилина в ледяной уксусной кислоте	Выдерживают при температуре 65±1°С на водяной бане в течение 10 мин	-	605 нм (β-эсцин)

Таблица 3 – Условия для качественного определения ТС каштана конского методом ТСХ

Элюенты	Проявители	Стандартный образец	Разделенные БАВ	Пластины для ТСХ
1	2	3	4	5
Эсцин в пероральных лекарственных препаратах [214, 216, 266]				
пропанол-этилацетат-вода (3.5:4.5:2)	5%-ный раствор ванилина в метаноле/серной кислоте и 10%-ный раствор серной кислоты в этаноле	эсцин	R_f =0,28	10х10 см
Н-бутанол-уксусная кислота ледяная-вода (30:7:13)				
Семена каштана конского [26, 90, 126, 200]				
Н-бутанол-уксусная кислота ледяная-вода (5:1:4)	Раствор анисового альдегида уксусной кислоте в этаноле, при температуре 100–105 °С в течение 5 мин и просматривают при дневном свете	0,5% раствор эсцина в метаноле	Зона адсорбции от серого до голубовато-фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции СО эсцина; допускается обнаружение других зон ТС	ТСХ пластинка со слоем силикагеля
Н-бутанол-уксусная кислота ледяная-вода (4:1:2)	25% спиртовый раствор ФВК и выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100-105°С в течение 5 мин	Среди ТС семян имеет преобладающее пятно эсцин		
Н-бутанол-уксусная кислота ледяная-вода (84:7:14)	Погружение в суспензию эритроцитов барана с последующим смыванием избытка крови с поверхности пластины	Сапонины проявлялись в виде белых пятен на розовом фоне		
Цветки каштана конского [40]				
Н-бутанол-этанол-аммиак конц. (7:2:5)	20% спиртовый раствор ФВК	0,1% спиртовый раствор β –эсцина	Зона адсорбции от серого до голубовато-фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции СО эсцина; допускается обнаружение других зон ТС	ТСХ пластинка со слоем силикагеля
Каштана конского экстракт густой [154]				
ледяная уксусная кислота-гексан-метанол (4:1:1)	Смесь (1:1) 3% раствора n-диметиламинобензальдегида в 80% этиловом спирте и 72% раствора серной кислоты	эсцин	На хроматограмме проявлялись пятна серо-фиолетового цвета. Пятно с R_f =0,55 на уровне СО эсцина	-
Сбора ангиопротекторный (в составе конского каштана семена) [90]				
хлороформ-этанол-вода (26:14:3)	25% спиртовой раствор ФВК	эсцин	ТС в виде пятен серо-фиолетового цвета. R_f= 0.02 (эсцин)	ПТСХ П-А-УФ-254

Приложение 9

Таблица 1 - Коэффициенты парной ранговой корреляции Спирмена для накопления изучаемых групп БАВ

	Сумма флавоноидов в пересчета на рутин	Сумма антоцианов, в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид	Сумма дубильных веществ в пересчете на танин	Сумма стеринов в пересчете на эргостерин	Сумма тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин	Сумма связанных и свободных сахаров в пересчете на глюкозу	Сумма свободных и связанных аминокислот
Сумма флавоноидов в пересчета на рутин	-	-	-	-	-	-	-
Сумма антоцианов, в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид	0,145	-	-	-	-	-	-
Сумма дубильных веществ в пересчете на танин	**0,870***	0,371	-	-	-	-	-
Сумма стеринов в пересчете на эргостерин	-0,116	-0,086	0,086	-	-	-	-
Сумма тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин	-0,058	-0,086	-0,029	**0,886***	-	-	-
Сумма связанных и свободных сахаров в пересчете на глюкозу	0,000	-0,486	-0,371	0,086	0,486	-	-
Сумма свободных и связанных аминокислот	-0,718	-0,200	-0,700	0,000	-0,100	-0,100	-
Сумма свободных органических кислот	-0,051	-0,300	0,200	0,500	0,100	-0,400	0,500

*$\rho_{набл} > \rho_{крит}$, зависимость признаков статистически значима ($p<0,05$)

Таблица 2 - Коэффициенты парной линейной корреляции Пирсона для накопления изучаемых групп БАВ

	Сумма флавоноидов в пересчета на рутин	Сумма антоцианов, в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид	Сумма дубильных веществ в пересчете на танин	Сумма стеринов в пересчете на эргостерин	Сумма тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин	Сумма связанных и свободных сахаров в пересчете на глюкозу	Сумма свободных и связанных аминокислот
Сумма флавоноидов в пересчета на рутин	-	-	-	-	-	-	-
Сумма антоцианов, в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид	0,136	-	-	-	-	-	-
Сумма дубильных веществ в пересчете на танин	**0,810***	0,105	-	-	-	-	-
Сумма стеринов в пересчете на эргостерин	-0,495	-0,290	0,050	-	-	-	-
Сумма тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин	-0,241	-0,085	0,116	0,782	-	-	-
Сумма связанных и свободных сахаров в пересчете на глюкозу	-0,132	-0,093	-0,306	0,159	0,610	-	-
Сумма свободных и связанных аминокислот	-0,754	0,080	-0,771	-0,052	-0,020	0,071	-
Сумма свободных органических кислот	-0,309	-0,473	-0,032	0,544	0,723	0,190	0,477

*$\rho_{набл} > \rho_{крит}$, зависимость признаков статистически значима ($p<0,05$)

Приложение 10

Таблица 1 – Результаты *in silico* прогноза видов фармакологической активности основных соединений, входящих в химический состав цветков каштана конского обыкновенного (Pa>0,7) с использованием платформы PASS-online

Фармакологические эффекты	γ-ситостерол		Эргостерин		β-эсцин		Рутин		Процианидин B2 (проантоцианидин B2)	
	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Антигиперхолестеринемический	0,960	0,002	0,926	0,003	-	-	-	-	-	-
Антагонист холестерина	0,957	0,001	0,951	0,001	-	-	-	-	-	-
Химиопрофилактическое	0,831	0,003	0,848	0,003	-	-	-	-	-	-
Гепатопротекторная активность	0,814	0,004	-	-	0,977	0,001	0,968	0,001	0,764	0,005
Ингибитор синтеза холестерина	0,778	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-
Противоотёчное средство	0,796	0,019	0,827	0,013	-	-	-	-	-	-
Противозудное средство	0,762	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-
Дерматологическое средство	0,759	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-
Иммунодепрессант	0,762	0,009	0,786	0,006	-	-	-	-	-	-
Лечение заболеваний костей	0,718	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-
Защищает слизистую оболочку	0,744	0,037	-	-	-	-	-	-	-	-
Лечение заболеваний предстательной железы	0,708	0,006	-	-	-	-	-	-	-	-
Противоостеопоротическое средство	0,706	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-
Гиполипидемический	-	-	0,860	0,005	0,852	0,005	-	-	-	-
Регулятор уровня кальция	-	-	0,713	0,003	-	-	-	-	-	-
Противоопухолевый	-	-	0,704	0,025	0,950	0,004	0,849	0,007	-	-
Иммуностимулятор	-	-	-	-	0,886	0,004	-	-	-	-
Противогрибковый	-	-	-	-	0,867	0,003	-	-	-	-
Противовоспалительное	-	-	-	-	0,846	0,005	-	-	-	-
Антитромботический	-	-	-	-	0,798	0,004	-	-	-	-
Противовирусный	-	-	-	-	0,717	0,005	-	-	-	-
Противоязвеный	-	-	-	-	0,701	0,005	-	-	-	-
Кровоостанавливающее	-	-	-	-	-	-	0,993	0,001	0,884	0,002
Ингибитор проницаемости мембран	-	-	-	-	-	-	0,990	0,001	-	-

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Кардиопротектор	-	-	-	-	-	-	0,988	0,001	-	-
Агонист целостности мембраны	-	-	-	-	-	-	0,984	0,001	0,968	0,002
Антиканцерогенный	-	-	-	-	-	-	0,983	0,001	0,757	0,007
Вазопротектор	-	-	-	-	-	-	0,980	0,001	-	-
Антиоксидант	-	-	-	-	-	-	0,923	0,003	0,803	0,003
Вазодилататор	-	-	-	-	-	-	0,740	0,006	-	-
Ингибитор пектатлиазы	-	-	-	-	-	-	-	-	0,919	0,001
Протектор мукомембран	-	-	-	-	-	-	-	-	0,907	0,005
Восстановитель	-	-	-	-	-	-	-	-	0,900	0,003
Антимутагенное	-	-	-	-	-	-	-	-	0,878	0,002
Фибринолитическое	-	-	-	-	-	-	-	-	0,872	0,003
Субстрат сульфотрансферазы	-	-	-	-	-	-	-	-	0,861	0,003
Ингибитор киназы	-	-	-	-	-	-	-	-	0,826	0,005
Вяжущее средство	-	-	-	-	-	-	-	-	0,809	0,001
Акцептор свободных радикалов	-	-	-	-	-	-	-	-	0,798	0,003
Ингибитор гистидинкиназы	-	-	-	-	-	-	-	-	0,789	0,004
Ингибитор липидной пероксидазы	-	-	-	-	-	-	-	-	0,741	0,004

Таблица 2 – Результаты *in silico* прогноза видов побочных и/или токсических эффектов основных соединений, входящих в химический состав цветков каштана конского обыкновенного (Pa>0,7) с использованием платформы PASS-online

Токсические эффекты	γ-ситостерол		Эргостерин		β-эсцин		Рутин		Процианидин B2 (проантоцианидин B2)	
	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
Нарушение сна	0,928	0,008	0,928	0,008	-	-	-	-	-	-
Эмбриотоксичен	0,890	0,005	0,795	0,013	-	-	0,831	0,010	-	-
Нарушение репродуктивной функции	0,876	0,010	-	-	-	-	-	-	-	-
Сонливость	0,864	0,013	0,924	0,007	-	-	0,887	0,010	-	-
Нефротоксическое	0,827	0,009	0,874	0,005	0,823	0,010	0,761	0,019	-	-
Головная боль	0,781	0,023	0,868	0,011	-	-	-	-	-	-
Гастротоксичность	0,784	0,028	-	-	-	-	0,726	0,040	-	-
Тошнота	0,743	0,033	-	-	-	-	-	-	-	-
Головокружение	0,721	0,034	0,895	0,010	-	-	-	-	-	-
Брадикардия	-	-	0,857	0,006	-	-	-	-	-	-
Астма	-	-	0,799	0,012	-	-	-	-	-	-
Токсичный	-	-	-	-	0,974	0,003	-	-	-	-
Мышечная слабость	-	-	-	-	0,967	0,003	-	-	-	-
Слабость	-	-	-	-	0,947	0,005	-	-	-	-
Гематотоксическое	-	-	-	-	0,912	0,010	0,825	0,022	-	-
Цитотоксический	-	-	-	-	0,846	0,003	-	-	-	-
Гепатотоксичен	-	-	-	-	0,846	0,015	-	-	-	-
Поведенческие расстройства	-	-	-	-	0,817	0,002	-	-	-	-
Гастроэнтеротоксичность	-	-	-	-	0,772	0,030	-	-	-	-
Воспаление	-	-	-	-	-	-	0,952	0,004	0,737	0,021
Нейротоксичный	-	-	-	-	-	-	0,882	0,007	-	-
Диарея	-	-	-	-	-	-	0,85	0,017	0,727	0,035
Тератоген	-	-	-	-	-	-	0,823	0,010	-	-
Потеря веса	-	-	-	-	-	-	0,702	0,022	-	-
Сосудистая токсичность	-	-	-	-	-	-	-	-	0,757	0,026

Приложение 11

Таблица 1 – Изучение влияния настоя цветков каштана конского на выживаемость *Paramecium caudatum* в тесте «Функциональная нагрузка» на начальном этапе (без инкубации)

Исходно (0 ч) Проба/Время цикла, через n мин.	0 мин	1 мин	2 мин	3 мин	4 мин
Контрольная проба	34,00±2,042	22,02±1,169+++	12,47±1,261+++	2,20±0,480+++	0,67±0,303+++
Разница с исходным, %	-	-35,2	-63,3	-93,5	-98,0
Опытная проба 1:10	39,60±2,015*	30,00±1,817***,++	16,00±1,643+++	6,20±0,860+++	0,80±0,583+++
Разница с контролем, %	+16,5	+36,2	+28,3	в 2,82 раза	+19,4
Разница с исходным, %	-	-24,2	-59,6	-84,3	-98,0
Опытная проба 1:100	31,80±1,463	21,60±2,379++	13,60±2,522+++	3,20±1,281+++	0,40±0,245+++
Разница с контролем, %	-6,5	-1,9	+9,1	+45,5	-40,3
Разница с исходным, %	-	-32,1	-57,2	-89,9	-98,7
Опытная проба 1:1000	30,20±1,908	23,40±0,748++	13,00±1,517+++	3,40±1,364+++	0,40±0,245+++
Разница с контролем, %	-11,2	+6,3	+4,3	+54,5	-40,3
Разница с исходным, %	-	-22,5	-57,0	-88,7	-98,7

Примечание: + – P<0,05; ++ – P<0,01, +++ – P<0,001 – достоверность различий при сравнении с исходным по группе показателем; * – P<0,05; ** – P<0,01, *** – P<0,001 – достоверность различий при сравнении между опытными и контрольными показателям

Таблица 2 – Изучение влияния настоя цветков каштана конского на выживаемость *Paramecium caudatum* в тесте «Функциональная нагрузка» после 1 часа инкубации

Инкубация 1 ч Проба/Время цикла, через n мин.	0 мин	1 мин	2 мин	3 мин	4 мин
1	2	3	4	5	6
Контроль	36,53±1,942	30,47±2,488+	11,73±1,368+++	1,67±0,599+++	0,40±0,214+++
Разница с исходным, %	+7,4	-16,6	-67,9	-95,4	-98,9
Опытная проба 1:10	47,60±1,536***,++	25,60±1,288***,+++	16,20±1,934*,+++	6,60±1,470**,+++	1,80±0,860+++
Разница с контролем, %	+30,3	-16,0	+38,1	в 3,95 раза	в 4,50 раза

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6
Разница с исходным, %	+20,2	-35,4	-59,1	-83,3	-95,5
Опытная проба 1:100	38,80±1,828+	22,20±2,083*,++	11,80±0,970+++	3,60±1,364+++	1,00±0,632+++
Разница с контролем, %	+6,2	-27,1	+0,6	в 2,16 раза	в 2,50 раза
Разница с исходным, %	+22,0	-30,2	-62,9	-88,7	-96,9
Опытная проба 1:1000	32,00±1,414*	22,80±2,035*,+	11,80±1,655+++	1,20±0,583+++	0,40±0,245+++
Разница с контролем, %	-12,4	-25,2	+0,6	-28,1	0,0
Разница с исходным, %	+6,0	-24,5	-60,9	-96,0	-98,7

Примечание: + – P<0,05; ++ – P<0,01, +++ – P<0,001 – достоверность различий при сравнении с исходным по группе показателем; * – P<0,05; ** – P<0,01, *** – P<0,001 – достоверность различий при сравнении между опытными и контрольными показателям

Таблица 3 – Изучение влияния настоя цветков каштана конского на выживаемость *Paramecium caudatum* в тесте «Функциональная нагрузка» после 2 часа инкубации

Инкубация 2 ч Проба/Время цикла, через n мин	0 мин	1 мин	2 мин	3 мин	4 мин
Контроль	32,80±1,384	18,93±1,361+++	8,87±1,077+++	1,93±0,658+++	0,80±0,341+++
Разница с исходным, %	-3,5	-42,3	-73,0	-94,1	-97,6
Опытная проба 1:10	29,00±1,378*,++	21,20±1,200+++	12,40±1,030*,+++	5,40±1,122**,+++	2,20±0,860+++
Разница с контролем, %	-11,6	+12,0	+39,8	в 2,80 раза	в 2,75 раза
Разница с исходным, %	-26,8	-46,5	-68,7	-86,4	-94,4
Опытная проба 1:100	26,00±1,732**,+	19,80±1,855+++	12,00±0,775*,+++	2,00±0,707+++	0,80±0,374+++
Разница с контролем, %	-20,7	+4,6	+35,3	+3,6	0,0
Разница с исходным, %	-18,2	-37,7	-62,3	-93,7	-97,5
Опытная проба 1:1000	34,60±1,860	18,20±0,970+++	8,60±0,980+++	0,80±0,490+++	0,40±0,400+++
Разница с контролем, %	+5,5	-3,9	-3,0	-58,5	-50,0
Разница с исходным, %	+14,6	-39,7	-71,5	-97,4	-98,7

Примечание: + – P<0,05; ++ – P<0,01, +++ – P<0,001 – достоверность различий при сравнении с исходным по группе показателем; * – P<0,05; ** – P<0,01, *** – P<0,001 – достоверность различий при сравнении между опытными и контрольными показателям

Таблица 4 – Изучение влияния настоя цветков каштана конского на выживаемость *Paramecium caudatum* в тесте «Функциональная нагрузка» после 24 часов инкубации

Инкубация 24 ч Проба/Время цикла, через n мин	0 мин	1 мин	2 мин	3 мин	4 мин
Контроль	24,07±1,165+++	16,00±0,894+++	7,93±0,963+++	1,13±0,389+++	0,20±0,107+++
Разница с исходным, %	-29,2	-33,5	-67,1	95,3	-99,2
Опытная проба 1:10	29,80±0,735***,++	18,80±2,131+++	11,40±1,400*,+++	3,60±0,812***,+++	2,00±0,894*,+++
Разница с контролем, %	+23,8	+17,5	+43,8	в 3,19 раза	в 10,00 раз
Разница с исходным, %	-24,7	-52,5	-71,2	-90,9	-94,9
Опытная проба 1:100	27,20±1,356*,+	16,00±0,837+++	10,80±1,068*,+++	2,80±1,158*,+++	1,60±1,030+++
Разница с контролем, %	+13,0	0,0	+36,2	в 2,48 раза	в 8,00 раз
Разница с исходным, %	-14,5	-49,7	-66,0	-91,2	-95,0
Опытная проба 1:1000	26,40±0,927	17,00±2,864++	8,60±1,400+++	3,40±1,166*,+++	0,80±0,800+++
Разница с контролем, %	+9,7	+6,3	+8,4	в 3,01 раза	в 4,00 раза
Разница с исходным, %	-12,6	-43,7	-71,5	-88,7	-97,4

Примечание: + – P<0,05; ++ – P<0,01, +++ – P<0,001 – достоверность различий при сравнении с исходным по группе показателем; * – P<0,05; ** – P<0,01, *** – P<0,001 – достоверность различий при сравнении между опытными и контрольными показателям