

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И АНАЛИЗА ЭКСТРАКТА ЖИДКОГО ИЗ ЛИСТЬЕВ И ЦВЕТКОВ КАШТАНА КОНСКОГО ОБЫКНОВЕННОГО В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО И ВЕНОТОНИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА

© 2015 Л.Н. Савченко¹, Т.Ф. Маринина¹, В.А. Карпенко¹, А.С. Саушкина²

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал
Волгоградского государственного медицинского университета

²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург

Статья поступила в редакцию 15.11.2015

Изучен состав биологически активных веществ (БАВ) цветков и листьев каштана конского обыкновенного. Установлено наличие значительных количеств сапонинов, флавоноидов, дубильных веществ, что определило противовоспалительное и венотонирующее действие водно-спиртовых извлечений. Разработана технологическая схема получения жидкого экстракта из листьев и цветков каштана конского обыкновенного 1:1, в основе которой лежит экстракция БАВ 70% этиловым спиртом методом реперколяции. Результаты исследований показали противовоспалительную активность предлагаемого жидкого экстракта. Предложены методики качественного и количественного анализа сапонинов и флавоноидов в жидком экстракте каштана конского обыкновенного.

Ключевые слова: *листья и цветки каштана конского обыкновенного, флавоноиды, сапонины, жидкий экстракт*

Во всём мире растёт интерес к лечебным и профилактическим средствам из лекарственного растительного сырья. Фитопрепараты оказывают системное воздействие на организм, регулируя функции различных взаимосвязанных систем органов. Длительное применение средств растительного происхождения практически не вызывает развития аллергических реакций, побочных эффектов, что несомненно увеличивает актуальность использования лекарственных растений. Неблагоприятная экологическая обстановка приводит к обострению ряда заболеваний со стороны сосудистой системы организма человека, таких как атеросклероз, тромбоз и другие.

Плоды каштана конского обыкновенного являются ценным сырьём для получения таких препаратов как «Эскузан», «Анавенол», которые применяются при варикозном расширении вен, острых и хронических тромбозах, трофических язвах голени, при нарушении артериального периферического кровообращения (атеросклероз сосудов конечностей, артериит, тромбоз мелких сосудов), при воспалении геморроидальных узлов без кровотечения. Цветки

и листья этого растения, широко применяемые при аналогичных заболеваниях в народной медицине, могли бы стать дополнительным источником для получения препаратов венотонирующего и противовоспалительного действия, мало изучены [3].

Цель исследований: получить суммарный экстракционный препарат из листьев и цветков каштана конского обыкновенного, обладающий противовоспалительным и венотонирующим действием.

В задачи исследования входило изучение фитохимического состава листьев и цветков каштана конского обыкновенного и определение основных групп фармакологически активных веществ; определение основных технологических показателей сырья и расчёт теоретической эффективности различных способов экстрагирования; выбор оптимального способа получения экстракта жидкого из листьев и цветков каштана конского обыкновенного 1:1; изучение противовоспалительной активности полученного экстракта.

Результаты и их обсуждение. Учитывая тот факт, что фармакологическое действие препарата из плодов каштана конского обыкновенного обусловлено в основном флавоноидами и сапонинами, изучение фитохимического состава листьев и цветков каштана было начато именно с этой группы БАВ. В водных извлечениях (1:10) из указанных видов сырья было установлено наличие тритерпеновых сапонинов по следующим реакциям:

Савченко Людмила Николаевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры технологии лекарств. E-mail: fleur-12012@yandex.ru

Маринина Тамара Филипповна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры технологии лекарств. E-mail: marininatoma@mail.ru

Карпенко Валентина Анатольевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии. E-mail: f-akademiya@mail.ru

Саушкина Анна Степановна, кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры военно-медицинского снабжения и фармации

- пенообразования с 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной и 0,1 М раствором натрия гидроксида;
 - образования осадка при взаимодействии с раствором свинца ацетата;
 - с концентрированной серной кислотой и 10% раствором железа(II) сульфата;

- с 10% раствором натрия нитрата и концентрированной серной кислотой;
 - гемолиза эритроцитов в изотоническом растворе.

Гравиметрическим методом проведено количественное определение сапонинов в пересчёте на абсолютно сухое сырьё, полученные результаты представлены в табл. 1

Таблица 1. Содержание сапонинов в листьях и цветках каштана конского

Навеска сырья, г	Найдено сапонинов, %	Метрологические характеристики	Навеска сырья, г	Найдено сапонинов, %	Метрологические характеристики
листья			цветки		
0,98735	2,50	$\bar{X} = 2,50$ $S_i = 0,1043$ $S_x = 0,0426$ $\Delta X = 0,1094$ $\varepsilon = 4,4$ $\bar{X} \pm \Delta X \% = 2,5 \pm 0,11\%$	0,99125	4,78	$\bar{X} = 4,76$ $S_i = 0,0844$ $S_x = 0,0345$ $\Delta X = 0,1002$ $\varepsilon = 2,0$ $\bar{X} \pm \Delta X = 4,76 \pm 0,10\%$
0,99485	2,52		0,99785	4,86	
0,97685	2,36		0,98675	4,65	
0,98525	2,40		0,99035	4,77	
0,99965	2,62		0,98925	4,67	
0,99525	2,60		0,99735	4,83	

Для идентификации дубильных веществ использовали водное извлечение, с которым проводили качественные реакции: с раствором желатина; с 5% раствором железоаммониевых квасцов появлялось черно-зелёное окрашивание, а при стоянии выпадал осадок; с бромной

водой образовывался осадок (конденсированные дубильные вещества) [2]. Количественное содержание конденсированных дубильных веществ в пересчёте на абсолютно сухое сырьё определяли перманганатометрически, полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2. Содержание дубильных веществ в цветках и листьях каштана конского

Навеска сырья, г	Найдено дубильных веществ, %	Метрологические характеристики	Навеска сырья, г	Найдено дубильных веществ, %	Метрологические характеристики
листья			цветки		
0,96060	10,52	$\bar{X} = 10,69$ $S_i = 0,1783$ $S_x = 0,0728$ $\Delta X = 0,1870$ $\varepsilon = 1,8$ $\bar{X} \pm \Delta X = 10,69 \pm 1,8\%$	0,95375	7,24	$\bar{X} = 7,64$ $S_i = 0,2257$ $S_x = 0,09216$ $\Delta X = 0,2368$ $\varepsilon = 3,1$ $\bar{X} \pm \Delta X = 7,64 \pm 3,1\%$
0,96375	10,66		0,97500	7,81	
0,96225	10,60		0,96835	7,54	
0,97215	10,90		0,97735	7,79	
0,96985	10,75		0,97305	7,83	
0,96865	10,71		0,96825	7,61	

В изучаемом сырьё определяли также наличие и количественное содержание флавоноидов. Предварительно готовили извлечение 90% спиртом этиловым. Идентификацию проводили с помощью химических реакций: с концентрированной хлористоводородной кислотой и цинковой пылью; с 2% раствором свинца ацетата основного. Природу флавоноидов устанавливали восходящей бумажной хроматографией в 15% уксусной кислоте. В качестве «свидетелей» использовали 0,1% спиртовые растворы рутина и кверцетина. Хроматограмму сначала просматривали в УФ-свете. Отмечали зоны: коричневая - рутин, жёлтая - кверцетин. Затем

обрабатывали парами аммиака, отмечали переход окраски в жёлто-зеленую. Таким образом, в листьях и цветках каштана конского обыкновенного обнаружено наличие рутина и следов кверцетина.

При проведении анализа спектров спиртовых извлечений из листьев и цветков каштана конского установлено наличие полос поглощения при 210-230 нм, 260-270 нм, 340-380 нм, общих для спиртовых извлечений (40%, 70% и 90% этиловым спиртом) из листьев и из цветков каштана конского. Наличие данных полос поглощения указывает на присутствие и в листьях, и в цветках каштана конского обыкновенного

флавонолов. Так как спиртовые извлечения из листьев и цветков каштана конского содержат сумму флавоноидов, то наблюдается небольшое смещение максимумов поглощения, но оно укладывается в интервалы, характерные для рутина. Это подтверждает, что флавоноиды, содержащиеся в листьях и цветках каштана конского, в основном представлены рутином.

В качестве стандарта при спектрофотометрической методе количественного определения суммы флавоноидов в экстракте использовали стандартный раствор рутина. Для выбора оптимального способа количественного определения флавоноидов в листьях и цветках каштана конского нами были изучены их дифференциальные спектры поглощения по реакции с алюминия хлоридом. Область максимального светопоглощения изучаемых спектров находится при длине волны около 410 нм. Эта область спектра значительно удалена от максимумов поглощения сопутствующих фенольных и других органических веществ содержащихся в исследуемом сырье, что даёт возможность более точного определения оптической плотности при данной длине волны. Предлагаемый метод позволяет проводить количественное определение суммы флавоноидов и их гликозидов в присутствии полисахаридов, органических кислот, сапонинов, эфирных масел и соединений других классов, содержащихся в исходном растительном сырье, которые не взаимодействуют с алюминия хлоридом. Кроме того, применение в качестве раствора сравнения извлечения из сырья без алюминия хлорида позволяет исключить влияние на результаты анализа сопутствующих растворенных веществ имеющих оптическую плотность при 410 нм. Количественное определение флавоноидов проводили после экстракции 40%, 70%, 90% спиртом [2]. Статистически обработанные результаты содержания суммы флавоноидов в листьях и цветках каштана конского (в пересчёте на рутин), рассчитанные на абсолютно сухое сырье, приведены в табл. 3. Наибольшее содержание суммы флавоноидов выделяется при использовании в качестве экстрагента 70% этилового спирта.

Таблица 3. Результаты количественного определения суммы флавоноидов в сырье

Экстрагент	Сырьё	
	листья	цветки
40% этиловый спирт	1,17±0,04%	1,42±0,04%
70% этиловый спирт	2,32±0,05%	1,91 ±0,05%
90% этиловый спирт	2,21 ±0,03%	1,48±0,03%

Данные проведенных фитохимических исследований показали, что листья и цветки

каштана конского содержат комплекс БАВ, аналогичных составу фармакологически активных веществ плодов каштана конского, которые являются сырьем для производства препарата эскузан. В связи с этим, представляло интерес изучить возможность использования листьев и цветков каштана конского для производства жидкого экстракта 1:1. В качестве экстрагента был выбран 70% этанол, так как он позволяет максимально извлечь сумму флавоноидов и значительную часть сапонинов, которые в основном и определяют фармакологическое действие листьев и цветков каштана конского. Для реализации и прогнозирования эффективности равновесных способов экстрагирования и качества получаемого препарата необходимо иметь информацию о товароведческих и технологических показателях качества лекарственного растительного сырья, о характере экстрагента, и условиях экстрагирования.

Товароведческие показатели качества сырья включают в себя влажность сырья (В), содержание экстрактивных веществ (Х), содержание фармакологических активных веществ. Технологические показатели складываются из коэффициента образования внутреннего сока (КОВС), коэффициента поглощения сырья (K_n), коэффициента увеличения объема при растворении экстрактивных веществ (Z) и плотности извлечения ($\rho_{из}$). Определение указанных технологических показателей сырья проводили по следующей методике: 10 г сырья (с известной влажностью), измельченного до частиц размером 5-7 мм, помещали в предварительно взвешенную склянку, закрывали её пробкой и взвешивали. Затем в склянку заливали экстрагент до образования слоя жидкости над поверхностью сырья высотой 50 мм, после чего склянку закрывали пробкой и снова взвешивали. Сырье настаивали 72 часа, перемешивая жидкую фазу не менее 6 раз в сутки. После настаивания извлечение сливали полностью в предварительно взвешенный цилиндр. Массу слитого извлечения фиксировали, его объём рассчитывали по массе и плотности. Плотность профильтрованного извлечения определяли по методике (ГФХИ). Содержимое пикнометра переносили в бюкс. Извлечение в бюксе выпаривали на кипящей водяной бане досуха и высушивали при температуре 100°C до постоянной массы. Бюкс охлаждали в эксикаторе 30 минут и взвешивали. Полученные результаты позволили приступить к расчетам эффективности различных способов экстрагирования и выбрать из них оптимальный для получения жидкого экстракта из листьев и цветков каштана конского обыкновенного [4]. Теоретически вычисленная эффективность экстракции

дает представление о предельно возможной степени истощения сырья и представлена в табл. 4.

Таблица 4. Расчёт теоретической эффективности различных способов экстрагирования

Показатель теоретической эффективности	Значение, %
метод мацерации	69,0
метод ремацерации	70,0
метод реперколяции с незавершенным циклом (n - число реперколяторов)	
n=3	95,8
n=4	97,6
n=5	98,8
n=6	99,4
n=7	99,7
n=8	99,9
метод реперколяции с завершенным циклом	97,1

Метод расчёта эффективности реперколяции с завершенным циклом связывает математической зависимостью величину эффективности процесса экстрагирования с величиной соотношения внешнего и внутреннего соков и числом ступеней экстракции, позволяет подобрать оптимальные условия экстрагирования [4, 5]. Для расчёта фактической эффективности «S_ф» промышленных способов экстрагирования в производственных условиях фиксируют: массу сырья, введенного в производство «G», содержание нормируемых веществ «X» в %. Вычисляют «S_ф» по данным регистрации объёма извлечения «a» и концентрации нормируемых веществ в % по объёму «Cи» по формуле:

$$S_{ф} = 100 \cdot a \cdot C_{и} / G \cdot X = 100 \cdot 100,7 \cdot 1,73 / 10 \cdot 25,17 = 69\%$$

где: $C_{и} = 100 \cdot b / V_1 = 100 \cdot 0,0861 / 4,99 = 1,73$

Теоретическая эффективность экстрагирования является пределом конкретного способа. Оценить количественно фактическую эффективность экстрагирования можно путём сравнения её с теоретической, для чего используют понятие относительной эффективности экстрагирования, которую вычисляют по формуле:

$$S_o = S_{ф} / S_{т} = 69\% / 69\% = 1$$

В результате проведенных расчетов видно, что эффективность реперколяции с завершенным циклом в батарее из трех перколяторов значительно высока и позволяет получить выход экстрактивных веществ 97,1%, что невозможно при использовании других методов экстрагирования, поэтому для получения жидкого экстракта

был выбран именно этот способ экстрагирования.

Для получения жидкого экстракта из листьев и цветков каштана конского 1:1 методом реперколяции с завершенным циклом были проведены расчёты сырья и экстрагента. В качестве экстрагента использовали 70% этанол, коэффициент поглощения экстрагента сырьем составил 4,2.

1. Расчёт общего количества экстрагента:

$$W = n \cdot G \cdot (K_n + y) = 3 \cdot 10 \cdot (4,2 + 1) = 156$$

где W - общий расход экстрагента, см³; n - число диффузоров в батарее (число ступеней экстракции); K_n - коэффициент поглощения экстрагента сырья см³/г; y - коэффициент съема готовой продукции см³/г; G - масса сырья одного диффузора, г.

2. Расчёт объёма экстрагента для одной ступени экстракции:

$$W = n \cdot G \cdot (K_n + y) = 10 \cdot (4,2 + 1) = 52 \text{ мл}$$

3. Расчёт объёма экстрагента поглощенного сырьем:

$$U = G \cdot K_n = 10 \cdot 4,2 = 42 \text{ мл}$$

4. Измельченных цветков и листьев каштана конского 30 г.

Экстрагирование проводили в батарее из 3-х перколяторов, загрузка каждого перколятора составила 10 г сырья, пусковой период составил трое суток; в течение трех суток рабочего периода получено 30 мл извлечения порциями по 10 мл ежедневно. Полученное извлечение отстаивали при температуре +8°C в течение 7 суток и фильтровали. Качественный анализ флавоноидов в жидком экстракте каштана конского проводили методом бумажной хроматографии в 15% уксусной кислоте. Просматривали после высушивания в УФ свете, отмечали зоны рутина и кверцетина. Обработывали хроматограмму парами аммиака, отмечая переход окраски в желто-зеленую. Параллельно для идентификации флавоноидов измеряли дифференциальные спектры поглощения раствора экстракта и стандартного раствора рутина.

Количественно жидкий экстракт оценивали по содержанию флавоноидов и сапонинов по ранее приведенным методикам полученные результаты приведены в табл. 5. Содержание флавоноидов в жидком экстракте из листьев и цветков каштана конского обыкновенного составляет $2,05 \pm 0,05\%$. Содержание сапонинов - $3,53 \pm 0,17\%$, что соответствует теоретически рассчитанному способу экстрагирования.

Таблица 5 Содержание суммы флавоноидов и сапонинов в жидком экстракте из листьев и цветков каштана конского обыкновенного

A _x	Найдено, %	Метрологические характеристики	Найдено		Метрологические характеристики
			г	%	
сумма флавоноидов			сапонины		
0,365	2,08	$\bar{X} = 2,05$ $S_i = 0,0498$ $S_x = 0,02033$ $\Delta X = 0,05$ $\varepsilon = 2,6$ $\bar{X} \pm \Delta X = 2,05 \pm 0,05\%$	0,35425	3,54	$\bar{X} = 3,53$ $S_i = 0,1593$ $S_x = 0,0649$ $\Delta X = 0,17$ $\varepsilon = 4,8$ $\bar{X} \pm \Delta X = 3,53 \pm 0,17\%$
0,352	2,00		0,36343	3,63	
0,350	1,99		0,3267	3,27	
0,369	2,10		0,37240	3,72	
0,357	2,03		0,34325	3,43	
0,370	2,10		0,36235	3,62	

Фармакологическое изучение жидкого экстракта из листьев и цветков каштана конского обыкновенного. Нами было изучено противовоспалительное действия жидкого экстракта из листьев и цветков каштана конского обыкновенного 1:1. Исследования проводили на беспородных белых крысах-самцах весом 180-200 граммов. В опыте использовали 12 животных. В эксперименте учитывались рекомендации и общепринятые методики для выявления противовоспалительного действия [50]. Для воспроизведения асептического воспаления крысам вводили

по 0,1 мл 10% взвеси каолина под апоневроз подошвы задней лапки. Полученный экстракт вводили перорально в количестве 2 мл в соотношении с водой 1:1 за 45 минут до введения каолина. Объем лапки крыс измеряли с помощью прибора до и после введения каолина через 4, 5, 24 и 48 часов. Величину отёка оценивали по объёму жидкости (в мл), вытесненной при погружении в неё пораженной лапки крысы [1]. Полученные данные обрабатывали статистически, результаты представлены в табл.6.

Таблица 6. Результаты исследования противовоспалительной активности экстракта из листьев и цветков каштана конского обыкновенного

Группа 1 животных	V до эксперимента, %	Через 4 часа, %	Через 5 часов, %	Через 24 часа, %	Через 48 часов, %
опыт	1,06±0,04	54,59±15,00	56,03±15,50	65,23±15,90	55,17±13,29
контроль	0,98±0,05	80,46±23,07	83,12±23,20	94,14±17,81	78,35±12,75

Прирост объёма лапки определяли в процентах. Критерием противовоспалительного действия исследуемого экстракта явилось изменение объёма экссудата лапки животного при приёме экстракта по сравнению с контрольными животными.

Выводы: изучен фитохимический состав листьев и цветков каштана конского обыкновенного, установлено наличие основных групп фармакологически активных веществ: сапонинов 2,5%; 4,76%, флавоноидов 2,32%; 1,91% , каротиноидов 1,8%; 0,12%, дубильных веществ 10,67%; 7,64%; полисахаридов 2,05%; 3,15% соответственно в листьях и цветках. Определены технологические показатели качества сырья, которые позволили рассчитать теоретическую эффективность различных способов экстрагирования. Установлено, что оптимальным способом экстрагирования для получения жидкого экстракта 1:1 является метод реперколяции с завершённым циклом в батарее из трех перколяторов. Жидкий экстракт из листьев и цветков каштана конского обыкновенного, полученный по предложенной

технологической схеме, отвечает требованиям НД на данный вид продукции. Разработаны методики стандартизации жидкого экстракта по содержанию суммы флавоноидов и сапонинов. Изучена противовоспалительная активность полученного жидкого экстракта, установлено наличие противоотечного и противовоспалительного действия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Беленький, М.Л.* Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. - М: Наука, 1963. 150 с.
2. Государственная фармакопея СССР. XI изд. Вып.1: Общие методы анализа. - М.: Медицина, 1987. 366 с.
3. *Носаль, М.А.* Лекарственные растения и способы применения в народной медицине/ М.А. Носаль, И.М. Носаль. - Минск: Полымя, 1997. 258 с.
4. *Пшуков, Ю.Г.* Производство экстракта водяного перца жидкого методом реперколяции с завершённым циклом/ Ю.Г. Пшуков, И.А. Муравьев // Фармация. 1986. Т. 35, № 5. С. 17-22.

5. Романцова, Н.А. Решение проблемы ресурсосбережения при получении экстракта жидкого из сбора лекарственного растительного сырья/ Н.А.

Романцова, Т.Ю. Манджиголодзе, Л.С. Кузнецова // Известия Самарского научного центра РАН. 2015. Т. 17, № 5. С. 188-192.

**DEVELOPMENT OF THE TECHNOLOGY AND THE ANALYSIS OF LIQUID EXTRACT
FROM LEAVES AND FLOWERS OF ORDINARY HORSE-CHESTNUT
AS ANTI-INFLAMMATORY AND VIENTONING DRUGS**

© 2015 L.N. Savchenko¹, T.F. Marinina¹, V.A. Karpenko¹, A.S. Saushkina²

¹Pyatigorsk Medical-pharmaceutical Institute – branch of
Volgograd State Medical University

²Military Medical Academy named after S.M. Kirov, S.Peterburg

The composition of the biologically active agents (BAA) of flowers and leaves of ordinary horse-chestnut is studied. Existence of the significant amounts of saponins, flavonoids, tannins that defined anti-inflammatory and viontoning action of aqueous-alcoholic extraction is established. The technological scheme of receiving liquid extract from leaves and flowers of ordinary horse-chestnut 1:1 which cornerstone extraction of BAA of 70% ethyl alcohol by a repercolation method is developed. Results of pharmacological researches showed the anti-inflammatory activity of the offered liquid extract. Techniques of the qualitative and quantitative analysis of saponins and flavonoids in liquid extract of ordinary horse-chestnut are offered.

Key words: *leaves and flowers of ordinary horse-chestnut, flavonoids, saponins, liquid extract*

Lyudmila Savchenko, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Drugs Technology Department. E-mail: fleur-l2012@yandex.ru

Tamara Marinina, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Drugs Technology Department. E-mail: marininatoma@mail.ru

Valentina Karpenko, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry. E-mail: f-akademiya@mail.ru

Anna Saushkina, Candidate of Pharmacy, Senior Lecturer at the Department of Military-medical Provision and Pharmacy