



MAHALLIY XOMASHYO ASOSIDA ESSIN VA UNING HOSILALARINI OLISH VA STANDARTLASH

Voxidov Bekzod Botir o'g'li

Toshkent farmatsevtika instituti 3-kurs talabasi, Toshkent sh.,

O'zbekiston, e-mail: bekdovvokhidov21@gmail.com

<https://doi.org/10.5281/zenodo.6024999>

MAQOLA TARIXI

Qabul qilindi: 15-dekabr 2021

Ma'qullandi: 15-yanvar 2022

Chop etildi: 5-fevral 2022

KALIT SO'ZLAR

soxta kashtan, triterpen
saponini, essin, fraksiya,
SARS-CoV-2, YuSSX-MS.

ANNOTATSIYA

Essin – Aesculus hippocastanum L. urug'ida asosiy komponent bo'lib, u 30 ga yaqin izomer va hosilalar ko'rinishida uchraydi. Essin – kapilyarprotektorlik, antiexsudativ, antitrombotik va yallig'lanishga qarshi faollikga ega. O'zbekistonda yetishtirilgan soxta kashtan urug'idan 95,0±3,6% tozalikdagi essin substansiyasi olish usuli ishlab chiqildi. Tozalangan essin moddasi saponinlarning molekulyar massasiga ko'ra 8 ta fraksiyaga ajratilib ularning o'zaro nisbatari tadqiq etildi. Essin substansiyaning asosiy qismini SF-1, SF-2, SF-4 va SF-7 fraksiyalari tashkil etishi isbotlandi.

So'nggi yillarda o'simlikdan olingan tabiiy ekstraktlar tibbiyot, farmakologiya va oziq-ovqat xavfsizligi sohasida katta rol o'ynamoqda. Tabiiy ravishda ajratib olingan biologik faol moddalar turli maqsadlarda ishlatilishi mumkin bo'lgan noyob biologik faollikni saqlaydi. Xususan, soxta kashtan tarkibidagi essin "Tibbiyot tarixidagi eng muhim hodisa" lardan biri bo'lgan SARS-CoV-2 viruslarini sezilarli darajada ingibirlashi isbotlangan. Bundan tashqari, soxta kashtandan ajratilgan birikmalarda saratonga qarshi faollik ham topilgan. Essin asosida olinadigan dori preparatlari Yevropa fitoterapiyasida yallig'lanish va venoz trombozini davolashda, mikrosirkulyatsiyasini yaxshilashda, shuningdek membrana o'tkazuvchanligini oshirish uchun dori vositasida sifatida keng qo'llaniladi. O'zbekistonda yetishtiriladigan soxta kashtan tarkibidagi kimyoviy

komponentlar shu kungacha batafsil o'rganilmagan.

Soxta kashtan urug'idan spirtli ekstrakt olish uchun ekstragent kontsentratsiyasi muhim rol o'ynaydi. Chunki, uning tarkibidagi biofaol moddalar (triterpen glikozidlar) spirt-suv aralashmasida yaxshi eriydi. Ekstraksiya jarayoni uchun spirt-suv aralashmasi kontsentratsiyasini aniqlash maqsadida quyidagi izlanishlar amalga oshirildi. Buning uchun xomashyo dastlab qattiq po'st qismidan (1-rasm) tozalash uchun 6 soat davomida tozalangan suvga solib qo'yildi (po'stini yumshatish uchun). So'ngra suvi to'kib tashlanib, urug'lar po'st qismidan tozalandi. Olingan toza kashtan urug'lari kukun holiga kelguncha maydalandi. So'ngra ekstragentning optimal kontsentratsiyasini aniqlash maqsadida 35, 45, 55, 65, 75 va 96 % kontsentratsiyali etil spirt bilan birgalikda 50 va 70 % kontsentratsiyali metanol, 0,5



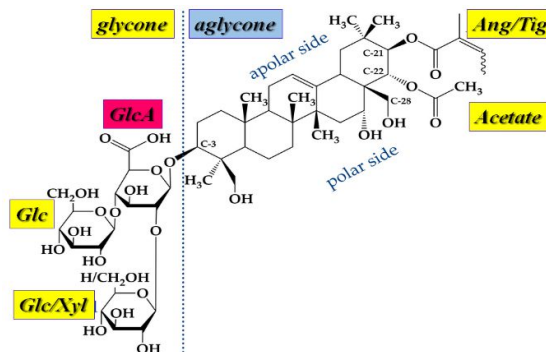


mol/l li natriy gidrokarbonat eritmalaridan



1-rasm. Soxta kashtan urug'larining tashqi ko'rinish

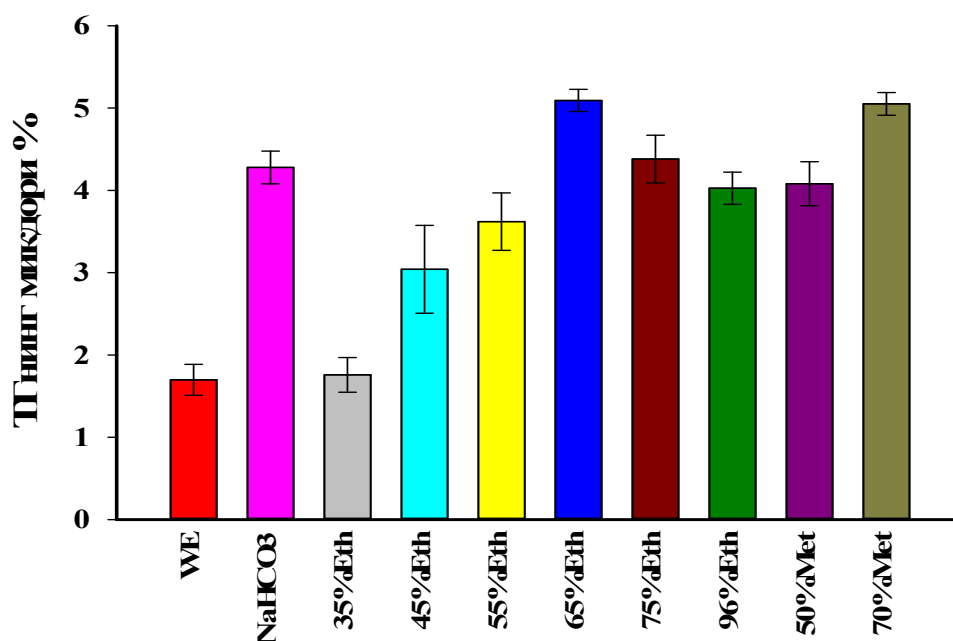
hamda suvdan foydalanildi.



2-rasm. Essin saponinlarining umumiy tuzilish formulasi

Buning uchun dastlab 10 ta ekstraktorga tozalab maydalangan soxta kashtan urug'i solinib, turli xil kontsentratsiyali (35, 45, 55, 65, 75 va 96%) etil spirti, 50 va 70% metanol, 0,5 mol/l natriy gidrokarbonat

hamda suv bilan ekstraksiya jarayoni olib borildi. Ajratib olingan ekstraktlar tarkibidagi triterpenlar glikozidlar (TTG) yig'indisi aniqlandi. Olingan natijalar 3-rasmda diagramma ko'rinishida keltirilgan.



Турли хил эритувчилар

3-rasm. Soxta kashtan biologik faol moddalarini ajralishida turli xildagi erituvchilarning ta'siri

3-rasmdan ko'rinib turibdiki, dastlab spirtning kontsentratsiyasi oshishi bilan ekstraktda triterpenlar glikozidlar miqdori oshgan, 55% va undan yuqori kontsentratsiyali spirt, 50% va 70% li

metanol hamda 0,5 mol/l natriy gidrokarbonatning ekstraksiya jarayoni uchun qo'llanilishi ekstraktda triterpenlar glikozidlar miqdorini oshishiga olib kelgan. Soxta kashtanning biologik faol moddalari





(TTG) yaxshi ekstraksiyalanib o'tadigan ekstragent 65% etil spirti (hajm bo'yicha) ekanligi tajribalarda aniqlandi. Bundan tashqari tajribadan olingan natijalarga ko'ra 70% li metanol (hajm bo'yicha)da ham 65% li etil spirti singari natija olingan lekin bu erituvchi zaharli va iqtisodiy jihatdan qimmat hisoblanadi.

3-rasmdan ko'rinib turibdiki ekstraksiya jarayonini kontsentratsiyasi 75 % va 96% li etil spirtida olib borilganda triterpenlar glikozidlarning miqdori kamayishi kuzatildi buning asosiy sababi 2-rasmda ko'rsatilgan essin saponinlarining tuzilish formulasidir, ya'ni C-3 dagi -OH guruhiga glyukoza, ksiloza va glukuron kislotalarining birikganligi, bundan tashqari C-21, C-22 va C-28 xolatdagi -OH guruhlarning eterifikatsiyalanishidir.

Shunday qilib, ekstraksiya jarayoni uchun optimal ekstragent tanlandi. Ekstraksiya jarayonni quyidagicha amalga oshirildi. Tozalab maydalangan soxta kashtan urug'i 65% etil spirti (hajm bo'yicha) bilan 1:5 nisbatda 70°C haroratda 300 ayl./daq. tezlikda 1 soat davomida aralashtirildi. Olingan aralashma sovutildi va filtrlandi. So'ngra neytral holatdagi kation almashinuvchi kolonkadan 2 soat davomida o'tkazildi. Ekstraktdagi spirt rotorli bug'latkichda vakuum ostida haydaldi. Quruq qoldiq 0,05 M natriy gidrokarbonat eritmasi yordamida (1:10) ultratovushli suv hammomida 20 daqiqa davomida ekstraksiyalandi. Olingan suvli ekstraktning pH qiymati xlorid kislota eritmasi bilan 2,5-3,0 ga keltirildi. Kislotali filtrat ajratuvchi voronkada teng miqdordagi kanakunjut moyi bilan

aralashtirildi. Yog' fazasi ajratildi va boshqa ajratuvchi voronkaga o'tkazildi, teng miqdordagi 80 % etanol bilan aralashtirilib, saponin fraksiyasi etanol fazasiga o'tkazildi va ushbu jarayon yana ikki marta takrorlandi.

Soxta kashtan ekstrakti tarkibidagi triterpenlar glikozidlarni sifat va miqdorini aniqlashda an'anaviy usullar bilan bir qatorda zamonaviy tezkor yuqori aniqlikdagi (YuSSX-MS) usullardan ham foydalanildi. Bu usul o'zining o'ta aniqliligi va soxta kashtan o'simligi tarkibidagi essin va uning izomerlarini massa zaryadlari bilan identifikatsiya qilish bilan boshqa fizik-kimyoviy usullardan ajralib turdi.

Tayyorlangan tekshiriluvchi va standart namuna eritmaları alohida-alohida 20 mkl miqdorda uskunaga (Shimadzu, LC-MS 2020) yuborildi. Xromatografiya 16 daqiqa davomida olib borildi. Qo'zg'almas va yuqori bosim ostida qo'zg'aluvchi fazalarda ajralgan moddalar ultrabinafsha va mass detektorlar yordamida qayd etildi.

YuSSX-MS usulining sharoitlari: qo'zg'almas faza Shim-pack XR-ODS II 75 L x 3 mm poralar o'lchami 2.2 mkm, qo'zg'almas faza harorati 40°C, qo'zg'aluvchan fazaning oqim tezligi 0,250 ml/min, to'lqin uzunligi 225 nm, tekshiriluvchi eritmaning yuborilish miqdori – 20 mkl, tekshiruv davomiyligi 16 min.

MS usulining sharoitlari: ESI- (manfiy), gaz harorati 350°C, skanerlash MS Scan, Nebulirer 1,5 ml/min, Dry Gas 15 l/min, massa zaryadlari 100-2000 m/z, dastur LabSolution va MassHunter.

1-jadval

Qo'zg'aluvchi faza o'zgaruvchan tarkibi (vaqtga mos ravishda)

№	Vaqt, daq.	Qo'zg'aluvchi A faza, %	Qo'zg'aluvchi B faza, %
1	1	90	10
2	5	50	50





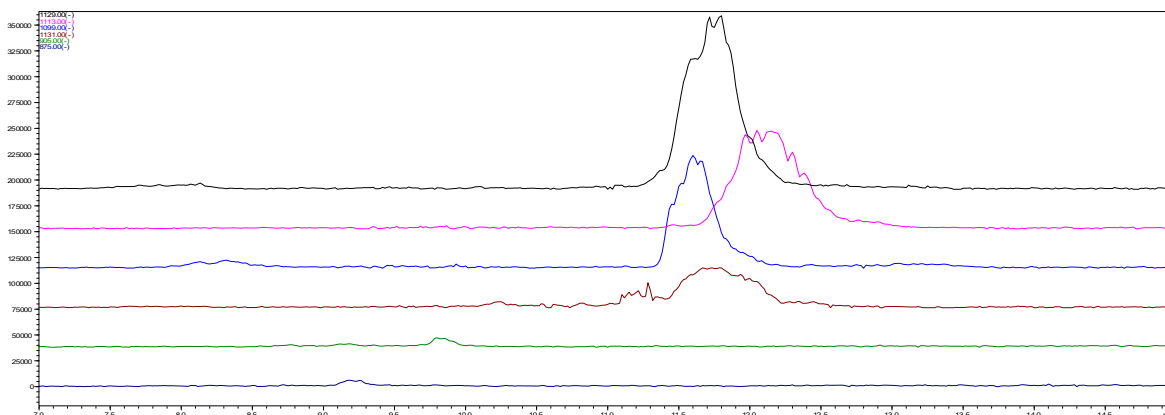
3	6	50	50
4	12	30	70
5	13	30	70
6	15	90	10
7	16	90	10

Qo'zg'aluvchan A fazani tayyorlash: 1 ml chumoli kislotasi olinib 1000 ml suvda eritildi. Hosil qilingan eritma muhiti potentsiometrik usulda aniqlandi (pH=2,5).

Qo'zg'aluvchi B faza: YuSSX uchun ishlatiladigan atsetonitrildan foydalanildi.

Natijalar: ESI- MS orqali o'tkazilgan tahlillar shuni ko'rsatdiki, massa spektrlari massa/zaryad [M-H]⁻ 1129, 1099, 1131,

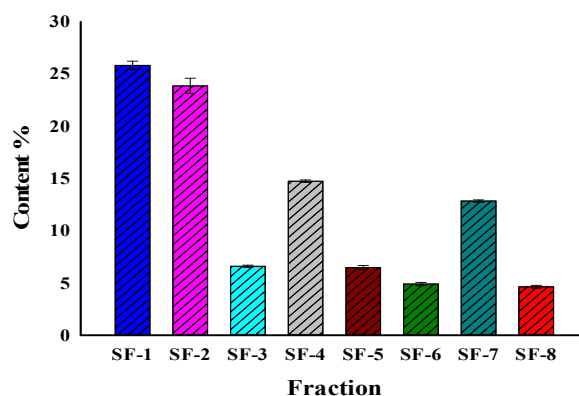
1113, 1089, 1117 va 1057 bo'lgan birikmalar aniqlandi (4-rasm). Saponinlar va hosilalarining kimyoviy tuzilishini tasdiqlash uchun ushbu birikmalarning strukturaviy tahlillari mass-spektrdan tashqari adabiyotlardagi ¹H NMR va ¹³C NMR ma'lumotlaridan foydalanib amalga oshirildi.



4-rasm. Essin substansiyasining YuSSX-MS xromatogrammasi

YuSSX-MS asosida sakkizta cho'qqilar guruhi identifikatsiya qilindi. Bizning tadqiqotda ES molekulyar massasiga ko'ra 8 ta fraksiyaga ajratildi va saponin fraksiya (SF) deb belgilandi (5-rasm va 2-jadval). Albatta bu fraksiyalarni biologik faolliklarini strukturasi bog'lab o'rganish

va ular orasidagi bog'liq qonuniyatlarini aniqlash juda muhimdir. Tadqiqotlar shuni ko'rsatdiki, ES tarkibida 30 ta triterpen saponinlari mavjud ekan. ES tarkibidagi 8 ta fraksiyaning miqdoriy ko'rsatkichlari o'rganildi.

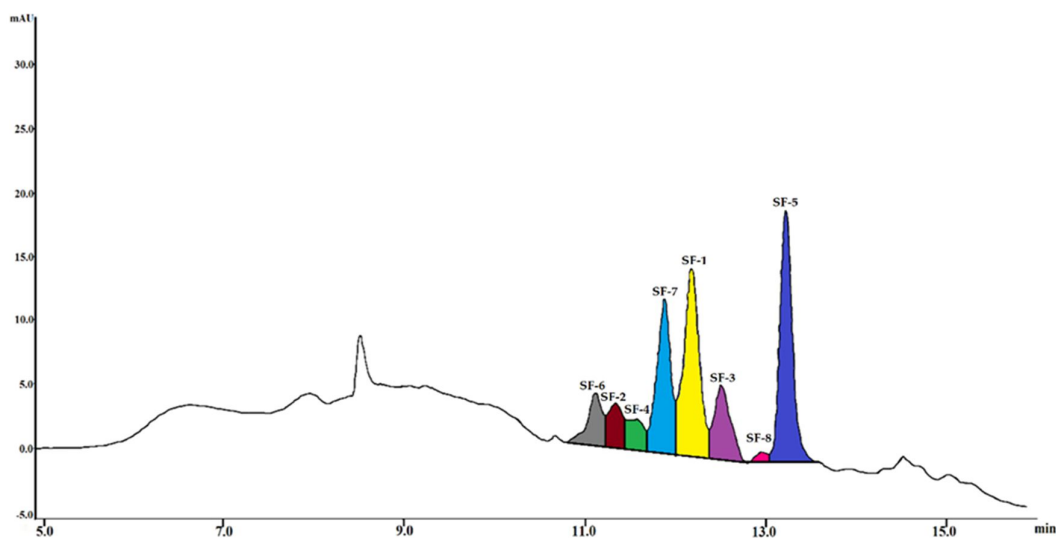




5-rasm. Ajratib olingan essin substansiyasining fraksion tarkib miqdori

Ularning miqdorlari SF-1 (Essin Ia, Essin Ib, Essin IVc, Essin IVd, Essin VIb, Isoescin Ia, Isoescin Ib, Isoescin VIIa) – 25,9%; SF-2 (Essin IIa, Essin IIb, Isoescin IIa, Isoescin IIb) – 23,7%; SF-3 (Essin IIIa, Essin IIIb, Isoescin IIIa, Isoescin IIIb, Isoescin VIIIa,) – 6,6%; SF-4 (Essin IV) – 14,7%; SF-5 (Essin IVe, Essin IVf, Essin IVg, Essin IVh,

Deacetylescin Ia, Deacetylescin Ib) – 6,5%; SF-6 (Essin V, Isoescin V) – 4,9%; SF-7 (Essin VI, Isoescin VIa) – 12,8%; SF-8 (Deacetylescin IIa, Deacetylescin IIb) – 4,7%. Ushbu natijalardan ko'rinib turibdiki, ES ning qariyb 50% ni SF-1 va SF-2 lar tashkil etmoqda. Eng kam miqdorni esa SF-8 tashkil etgan.



6-rasm. Soxta kashtan urug' ekstrakt namunasining YuSSX-DMD xromatogrammalari

Tadqiqotlar natijasida essinni ajratishda qo'llanilgan usul boshqa usullardan farq qilib, substansiya tarkibida essinning asosiy komponentlari (m/z lari $[M-H]^- = 1099$, $[M-H]^- = 1113$, $[M-H]^- = 1129$, $[M-H]^- = 1131$) miqdori oshirishga erishildi. Essin substansiyasini uning tarkibidagi moddalar molekular massasiga qarab fraksiyalarga ajratish orqali miqdori ko'p bo'lgan izomer hosilalar aniqlandi. Jumladan, essin substansiyasi tarkibidagi fraksiyalarning miqdorlari nisbati mos ravishda 5,51; 5,04; 1,40; 3,14; 1,38; 1,04; 2,72; 1 bo'lishi tadqiqotlar orqali isbotlandi. Bu esa o'z navbatida uning biologik faolligi ham tarkibidagi fraksiyalar bilan bog'liq deyish mumkin. Buning uchun essinning har bir fraksiyalari biologik

faolligini alohida-alohida tadqiq etilishi, so'ngra yakuniy xulosa qilish mumkin bo'ladi.

Xulosa: O'zbekistonda yetishtirilgan soxta kashtan urug'idan birinchi marta essin ekstrakti ajratildi. Urug'lardagi essinlar miqdori $4,2 \pm 1,3$ % ekanligi aniqlandi. Ekstraktni qayta ishlash asosida essin miqdori $95,0 \pm 3,6$ % dan yuqori bo'lgan substansiya olish usuli ishlab chiqildi. Tozalangan essin moddasi saponinlarning molekulyar massasiga ko'ra 8 ta fraksiyaga ajratilib ularning o'zaro nisbatari tadqiq etildi. Essin substansiyaning asosiy qismini SF-1, SF-2, SF-4 va SF-7 fraksiyalari tashkil etishi isbotlandi.





2-jadval.

Soxta kashtan urug'laridan ajratilgan essin saponinlarining fraksion guruhlari.

Fraksiya	Ushlanish vaqti, daq.	Nomi	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	m/z; [M-H] ⁻
SF-1	11.941	Essin Ia	H	Tig	Ac	OH	H	Glc-p	!129
		Essin Ib	H	Ang	Ac	OH	H	Glc-p	
		Essin IVc	H	H	Tig	OH	Ac	Glc-p	
		Essin IVd	H	H	Ang	OH	Ac	Glc-p	
		Essin VIb	Ang	Ac	H	OH	H	Glc-p	
		Izoessin Ia	H	Tig	H	OH	Ac	Glc-p	
		Izoessin Ib	H	Ang	H	OH	Ac	Glc-p	
		Izoessin VIIa	H	Tig	H	OH	Ac	Gal-p	
SF-2	10.791	Essin IIa	H	Tig	Ac	OH	H	Xyl-p	1099
		Essin IIb	H	Ang	Ac	OH	H	Xyl-p	
		Izoessin IIa	H	Tig	H	OH	Ac	Xyl-p	
		Izoessin IIb	H	Ang	H	OH	Ac	Xyl-p	
SF-3	11.343	Essin IIIa	H	Tig	Ac	H	H	Gal-p	1113
		Essin IIIb	H	Ang	Ac	H	H	Gal-p	
		Izoessin IIIa	H	Tig	H	H	Ac	Gal-p	
		Izoessin IIIb	H	Ang	H	H	Ac	Gal-p	
		Izoessin VIIIa	H	Ang	H	H	Ac	Glc-p	
SF-4	10.782	Essin IV	H	Ac	Ac	OH	H	Glc-p	1089
SF-5	13.210	Essin IVe	H	H	H	OH	Tig	Glc-p	1087
		Essin IVf	H	H	H	OH	Ang	Glc-p	
		Essin IVg	H	H	Tig	OH	H	Glc-p	
		Essin IVh	H	H	Ang	OH	H	Glc-p	
		Deasetilessin Ia	H	Tig	H	OH	H	Glc-p	
		Deasetilessin Ib	H	Ang	H	OH	H	Glc-p	
SF-6	10.343	Essin V	H	MP	Ac	OH	H	Glc-p	1117
		Izoessin V	H	MP	H	OH	Ac	Glc-p	
SF-7	10.938	Essin VI	H	MB	Ac	OH	H	Glc-p	1131
		Izoessin VIa	H	MB	H	OH	Ac	Glc-p	
SF-8	12.587	Deasetilessin IIa	H	Tig	H	OH	H	Xyl-p	1057
		Deasetilessin IIb	H	Ang	H	OH	H	Xyl-p	

Foydalanilgan adabiyotlar:

1. [Fang, L., G. Karakiulakis, and M. Roth](#), Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? The Lancet. Respiratory medicine, 2020. **8**(4): p. e21-e21.
2. [Avci G.](#), Effects of escin mixture from the seeds of Aesculus hippocastanum on obesity in mice fed a high fat diet. Pharmaceutical biology, 2010. **48**(3): p. 247-252.





3. [Komes, D., et al.](#), *Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis*. *Phytochemical analysis*, 2011. **22**(2): p. 172-180.
4. [Zhang, Z., S. Li, and X.-Y. Lian](#), *An overview of genus Aesculus L.: ethnobotany, phytochemistry, and pharmacological activities*. *Pharmaceutical Crops*, 2010. **1**(1).
5. [Kim, J.W., et al.](#), *Antiviral escin derivatives from the seeds of Aesculus turbinata Blume (Japanese horse chestnut)*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2017. **27**(13): p. 3019-3025.
6. [Pittler M.H. and E. Ernst](#), *Horse chestnut seed extract for chronic venous insufficiency*. *Cochrane database of systematic reviews*, 2012(11).
7. [Wilkinson, J. and A. Brown](#), *Horse Chestnut-Aesculus Hippocastanum: Potential Applications in Cosmetic Skin-care Products*. *International journal of cosmetic science*, 1999. **21**(6): p. 437-447.
8. [Wu, C.Y., et al.](#), *Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. **101**(27): p. 10012-10017.
9. [Li, B., et al.](#), *TIGAR knockdown enhanced the anticancer effect of aescin via regulating autophagy and apoptosis in colorectal cancer cells*. *Acta pharmacologica Sinica*, 2019. **40**(1): p. 111-121.
10. [Cheong, D.H., et al.](#), *Molecular targets and anti-cancer potential of escin*. *Cancer letters*, 2018. **422**: p. 1-8.
11. [Yoshikawa, M., et al.](#), *Bioactive saponins and glycosides. XII. Horse chestnut.(2): Structures of escins IIIb, IV, V, and VI and isoescins Ia, Ib, and V, acylated polyhydroxyoleanene triterpene oligoglycosides, from the seeds of horse chestnut tree (Aesculus hippocastanum L., Hippocastanaceae)*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 1998. **46**(11): p. 1764-1769.
12. [Matsuda, H., et al.](#), *Antiinflammatory effects of escins Ia, Ib, IIa, and IIb from horse chestnut, the seeds of Aesculus hippocastanum L.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1997. **7**(13): p. 1611-1616.

