

ДОКАЗОВА ФАРМАЦІЯ: ОДЕРЖАННЯ Й ВИВЧЕННЯ ЕСЦИНУ З ОКОЛОПЛОДНЯ AESCULUS HIPPOCASTANUM L.

EVIDENCE-BASED PHARMACY: OBTAINING AND STUDYING OF AESCINE FROM THE PLANT OF AESCULUS HIPPOCASTANUM L.

Анатолій Деркач (Anatolii Derkach)¹, Аліна Бутко (Alina Butko)², Сергій Негрецький (Serhii Nehretskii)^{1*}

Received: August 10, 2021

Published: August 27, 2021

¹ Харківська медична академія післядипломної освіти, Харків, Україна (Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv, Ukraine)

² Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна (Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine)

*Corresponding author: Serhii Nehretskii, affiliated to Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv, Ukraine

Abstract. The quality and life expectancy of the population depends on the level of access to modern, high quality, effective and evidence-based medical and pharmaceutical care. These types of care play a significant role in the pharmacotherapy of cardiovascular diseases, which are one of the main medical, biological and socio-economic problems of society. The main nosologies that cause high mortality from cardiovascular disease are heart attacks, strokes, sudden death syndrome and cardiomyopathy, which are preceded by such pathological conditions as hypertension, life-threatening arrhythmias, angina, chronic venous insufficiency. The aim of the study was to obtain and study

aescine from the amniotic fluid of Aesculus hippocastanum L. The pericarp of the plant Aesculus hippocastanum L. as a source of aescine was studied. As a vegetable raw material for the production of aescine we used amniotic horse chestnut. A new method for the isolation of aescine by its extraction from horse chestnut n-butanol saturated with water, followed by purification of the target product with aluminum oxide. The amniotic fluid of horse chestnut on the content of aescine were studied. Found that the content of aescine in this raw material ranges from 1.5% to 2.5%.

Keywords: evidence-based pharmacy, aescine, Aesculus Hippocastanum l.

Вступ. Якість і тривалість життя населення залежить від рівня доступності до сучасної, якісної, ефективної і доказової медичної і фармацевтичної допомоги. Зазначені види допомоги відіграють значну роль у фармакотерапії серцево-судинних захворювань (ССЗ), які є однією з головних медико-біологічних і соціально-економічних проблем соціуму. ССЗ стають причиною 67% усіх

летальних випадків в Україні. Для порівняння: у Франції і Японії ця складова в структурі летальності населення дорівнює 29%, у США – 31%. До основних нозологій, що обумовлюють високу смертність населення від ССЗ, становляться інфаркти, мозкові інсульти, синдром раптової смерті і кардіоміопатії, яким передують такі патологічні стани, як артеріальна гіпертензія аритмії, що життєво загрожують, стенокардія, хронічна венозна недостатність [1 - 3].

На сьогоднішній день хронічна венозна недостатність є найпоширенішою патологією периферичних судин. Згідно з епідеміологічними даними різні форми цього захворювання зустрічаються в 26-38 % жінок і в 10-20 % чоловіків працездатного віку. Щорічний приріст нових випадків захворювання в жителів індустріально розвинених країн досягає 2,6 % серед жінок і 1,9 % серед чоловіків. Фахівці зв'язують це з погіршенням екології, збільшенням частоти стресових ситуацій, уживанням спиртних напоїв, палінням, малорухливим способом життя, статичними перевантаженнями. По вікових особливостях ССЗ мають тенденцію до омолодження. Хронічна венозна недостатність є не тільки косметичною проблемою (варикотромбофлебіти, трофічні порушення шкіри, виразки) значно знижують працездатність, порушують соціальну адаптацію і якість життя хворих, а також можуть привести до ССЗ (інсульт, інфаркт міокарда, тромбоемболія легеневих артерій), які чреваті летальним результатом. Саме тому фармакотерапія хронічної венозної недостатності повинна починатися із самих ранніх доклінічних стадій розвитку захворювання. Універсальних лікарських засобів для фармакотерапії хронічна венозна недостатність дотепер не створене. Спектр дії більшості з них досить вузький (декстрани впливають на реологію крові, антиагреганти зменшують агрегаційну активність тромбоцитів, венотоніки поліпшують тонус венозної стінки). Для досягнення оптимального лікувального ефекту лікарям доводиться застосовувати кілька препаратів різних клініко-фармакологічних груп. Ідеальний препарат для лікування хронічної венозної недостатності повинен впливати на як можна більшу кількість патогенетичних ланок захворювання, при цьому мати мінімальну кількість побічних ефектів і високу біодоступність. Зазначені завдання успішно вирішують рослинні препарати, що займають до 70% ринку ангіопротекторних і венотонізуючих засобів [4-7].

Організаційно-правовим питанням створення лікарських засобів на основі відомих фармакологічних субстанцій та фітокомпозицій були присвячені публікації Грицика А.Р., Гудзенко О.П., Комісаренко М.Ф., Пономаренко Н.С., Прокопенко О.П., Спіридонова В.М., Чуєшова В. І., Шаповалової В.О., Шаповалова В.В., Yoshikawa M., Narada E., Murakami T. та інших [8 - 13].

В останні роки фармакологічними субстанціями на основі фітокомпозицій є екстракти, отримані з рослинної сировини з використанням спеціальної технології і стандартизовані по основних біологічно активних з'єднаннях.

Враховуючи вищенаведені факти, представляється актуальним завданням розробка нових фітопрепаратів з венотонізуючими властивостями. Перспективною фітосировиною для розв'язання поставленого завдання є насіння кінського каштана звичайного – джерело есцину. Батьківщиною каштана

кінського (*Aesculus hippocastanum* L.) є Балканський півострів. В Україні каштан кінський культивується як декоративне дерево. У насіннях навколопліддя каштана кінського знаходяться кумарини, сапоніни, флавоноїди, ліпіди, меланін і інші біологічно активні речовини. Насіння каштана кінського (*Semen Hippocastani*) є сировиною для виготовлення ряду лікарських препаратів: «Ескузан», «Венітан», «Есфлазид», «Анавенол», «Ессавен-Гель» і «Веноплант» – препарати, що містить сапонін, есцин і суму флавоноїдів з листя каштана кінського. Вони застосовуються як венотонізуючі і антитромбічні засоби при застої крові в нижніх кінцівках, розширенні вен, геморої й виразках гомілки [16, 17].

У літературі відомі способи одержання різних лікарських форм із насіння каштана кінського звичайного різними способами. Наприклад, шляхом водно-спиртовою екстракції, з наступним концентруванням, обробкою хлороформом, етилацетатом, підкисленням водного залишку кислотою хлористоводневою. Вихід есцину при такому способі становить від 1,6% до 3,0% [18 - 21].

Метою роботи було одержання й вивчення есцину з околопліддя *Aesculus hippocastanum* L.

Матеріали та методи. Вивчення околопліддя рослини *Aesculus hippocastanum* L., як джерела одержання есцину. Встановлено, що вміст есцину в сировині становить від 1,5% до 2,5%. У якості методу виділення есцину з рослинної сировини запропонована екстракція її н-бутанолом, насиченим водою. У результаті гідролізу встановлено, що виділений есцин представлений такими агліконами, як есцигенін, баррингтогенол D, баррингтогенол C і протоесцигенін. Цукрова частина цих агліконів складається з D-глюкози, D-галактози, D-ксилози і D-глюкуронової кислоти. Околопліддя каштана кінського, зібраного у вересні 2019 року в лісопарковій зоні м. Харків (Україна), висушували й подрібнювали. 1 кг сировини двічі екстрагували п'ятикратною кількістю н-бутанолу, насиченого водою, при нагріванні до температури 70°C протягом 30 хв. Витяг концентрували до 3 л і пропускали через колонку, заповнену оксидом алюмінію (нейтральним) (h=10 см, (d=5 див) з метою остаточного видалення флавоноїдів. Очищений бутанольний витяг концентрували у вакуумі до видалення бутанолу, залишок розчиняли в 800 мл води очищеної. Після підкислення водяного розчину кислотою хлористоводневою концентрованою до pH 1.6-2, розчин нагрівали до 80-90°C и залишали на кристалізацію при кімнатній температурі. Через 24 години білі кристали, що випали, отфільтровували і промивали водою очищеною до нейтральної реакції. Отримані кристали висушували. Вихід есцину склав 2.2 %.

Отриманий есцин хроматографували на пластинках «Силуфол» у системі розчинників хлороформ-метанол (9:3) паралельно з достовірним зразком есцину. Хроматограму проявляли 25% етанольним розчином кислоти фосфорновольфрамової. При перегляді в денному світлі виявляються плями есцина блідо-вишневого кольору.

Для з'ясування агліконового складу виділеного есцину був проведений його кислотний гідроліз. Для цих цілей брали 5,0 г отриманого есцину, розчиняли в 100 мл 96% спирту, додавали 40 мл води очищеної і 12 мл кислоти

хлористоводневої концентрованої і гідролізували на киплячій водяній бані протягом 3 годин. Отриманий гідролізат охолоджували, додавали 200 мл води очищеної, аглікони екстрагували 200 мл хлороформу. Після розшарування хлороформний шар відокремлювали й обробляли водою очищеної до нейтральної реакції. Хлороформний витяг сушили над натрієм сульфатом безводним, хлороформ відганяли. Отриманий залишок розчиняли в 150 мл 5% метанольного розчину калію гідроксиду й нагрівали на кип'ячій водяній бані 1 годину в колбі зі зворотним холодильником. Потім суміш розбавляли водою, метанол відганяли, аглікони з водяного залишку витягали трьома порціями, по 100 мл кожна, сумішню хлороформ - етилацетат (1:1). Витяг відмивали водою від лугу і упарювали. Отримано 2.2 г суміші агліконів. Суміш агліконів розділяли на колонці, заповненої силікагелем. Колонку спочатку елюювали хлороформом, потім сумішню хлороформ – етанол (9.5:0.5) зі збільшенням вмісту етанолу до 50 %. Потім контролювали на пластинках «Силуфол» у системі розчинників хлороформ-метанол (9:1).

У результаті отримані та ідентифіковані аглікони: есцигенін, барринтогенол D, барринтогенол C и протоесцигенін (Табл. 1).

Таблиця 1. Тритерпенові аглікони, отримані після кислотного гідролізу есцину.

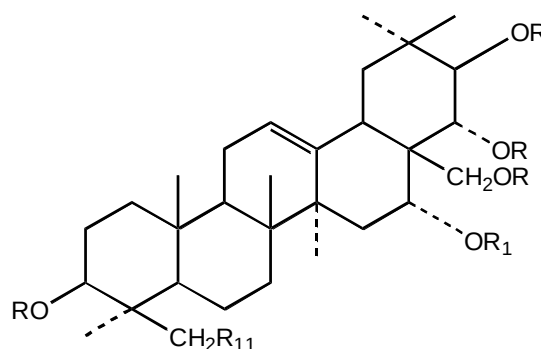
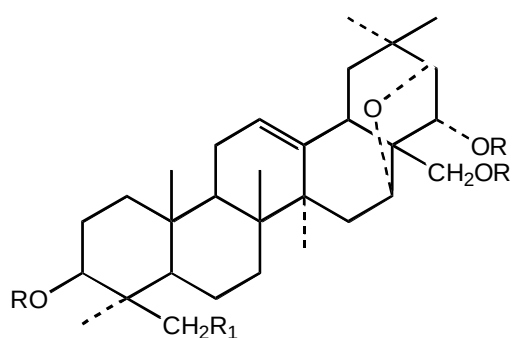
Назва аглікону	Загальна формула	Тпл., °C	[α] _D	R _f *
Есцигенін	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	305-310	+56,0 (EtOH)	0,62
Барринтогенол D	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	304-311	+48,0 (Диокс.)	0,66
Протоесцигенін	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	303-310	+32,0 (Диокс.)	0,42
Барринтогенол C	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	304-311	+34,0 (Диокс.)	0,50

Примітка: * – система розчинників хлороформ-метанол (9:1); EtOH – етанол, Диокс. – діоксан.

Водний залишок після витягу аглікону хроматографували на папері з достовірними зразками цукрів. У результаті хроматографічного дослідження в водному залишку виявлені: D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза D-глюкуронова кислота, основними з них є D-глюкоренова кислота і D-глюкоза.

Результати та їх обговорення. У якості рослинної сировини для одержання есцину нами використаний навколопліддя каштана кінського. Запропонований новий спосіб виділення есцину, шляхом його екстрагування з навколопліддя каштана кінського н-бутанолом, насиченим водою, з наступним очищенням цільового продукту алюмінієм оксидом. У результаті з навколопліддя каштана кінського нами виділений есцин, вихід 2.2 %.

Таким чином, кристалічний есцин є сумою кислих тритерпенових глікозидів, агліконова частина яких представлена похідними Δ¹²-олеанана [11]: есцигеніном, барринтогенолом D, барринтогенолом C и протоесцигеніном, етерифіковані ангеліковою, тиглиноюю, ізомасляною і оцтовою кислотами (Рис.1).



1. R=H; R1=OH. Есцигенін.

3. R=R1=H; R11=OH. Протоесцигенін.

2. R=R1=H. Баррингтогенол D.

4. R=R1=R11=H. Баррингтогенол C.

Рис. 1. Структура кристалічного есцину.

У якості цукрових компонентів есцину, як уже згадувалося, виявлені D-глюкуронова кислота, D-глюкоза, D галактоза і D-ксилоза, основним з них є D-глюкоренова кислота і D-глюкоза.

Після визначення фізичних властивостей отриманих агліконів і зіставлення з даними літератури, аглікони були ідентифіковані як есцигенін, баррингтогенол D, баррингтогенол C і протоесцигенін (Табл. 2). Отримані аглікони хроматографували зі свідомо відомими агліконами на пластинці «Силуфол» у системі розчинників хлороформ-метанол (9:1), що підтвердили їхню ідентичність.

У водному залишку, після кислотного гідролізу есцину, за допомогою хроматографії на папері в системі розчинників н-бутанол – кислота оцтова – вода (4:1:2) установили присутність D-глюкози, D-галактози, D-ксилози і D-глюкуронової кислоти.

Таблиця 2. Фізичні показники агліконів, виділених з околопліддя *Aesculus hippocastanum* L.

Речовина	Т _{пл} , °C	[α] _D	
		Величина	Розчинник
Есцигенін	303-310	+50	Етанол
Баррингтогенол D	303-309	+48	Діоксан
Баррингтогенол C	303-310	+41	Діоксан
Протоесцигенін	304-310	+38	Діоксан

Висновки. Вивчена навколопліддя каштана кінського на зміст есцину. Встановлено, що вміст есцину в даній сировині коливається від 1,5% до 2,5%. Запропонований метод виділення есцину із сировини екстракцією н-бутанолом, насиченим водою з наступним очищенням на оксиді алюмінію. Після гідролізу виділеного есцину ідентифіковані аглікони есцигеніни, баррингтогенол D, баррингтогенол C і протоесцигенін і цукри D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза і D-глюкуронова кислота. Встановлено, що необхідні подальші та більш поглиблені дослідження з цього напрямку.

Список літератури.

1. Slobozhansky chytannya. Medical and pharmaceutical law of Ukraine: materials of the X International scientific and practical conference. Kharkiv, Ukraine, 15-16 November 2013. Eds. V.V. Shapovalov, V.V. Shapovalov (Jr.), V.O. Shapovalova: 290 p.
2. Ministry of healthcare of Ukraine official site [Online] <http://www.moz.gov.ua/ua/portal>.
3. Shapovalov V.V., Sorokina E.V., Shapovalova V.A. Pharmacology of new psychotropic preparation. Materials of the 5th World Congress on “Innovations in psychiatry”. London, UK, 19-22 May 1998: P. 38.
4. Organizational and legal analysis of the pharmaceutical provision for the most common diseases of society / V. Shapovalov (Jr.), S. Zbrozhek, A. Gudzenko, V. Shapovalova, V. Shapovalov. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2018. Vol. 51. No. 18, P. 118 -124. URL: <http://globalresearchonline.net/journalcontents/v51-1/18.pdf>.
5. Shapovalova V., Kutko Y., Zabolotny V. Psychopharmacology aspects in pediatrics. Materials of the 6th World Congress of Biological Psychiatry. Nice, France, 22-27 June 1997: P.97 - 98.
6. Shapovalova V.A., Shapovalov V.V., Mikhailov V.S., Chayka L.A. Remedia “Zdorovye Narodu” / Under Edition V.A.Shapovalova. Kharkov: Rider, 1999. 200 p.
7. Likarski roslynny: Entsyklopedychnyi dovidnyk / Vidp. red. A.M. Hrodzinskyi. – K.: Holov. red. URE, 1990. – 544 s.
8. Petkov V. Sovremennaya fitoterapiya. Sofiya. 1988. S. 111-114.
9. Vasina J., Shapovalov V., Shapovalova V., Kovalyova K. The principles of the pharmaceutical law in solving problems of supplying patients with mental health problems with extemporal medicines. Research result (Medicine and pharmacy Series) 2015; 1(3): 18-29 <http://rr.bsu.edu.ru/images/issue3/medicine/medicine.pdf>.
10. Zharova O.G. Standartizatsiya konskogo kashtana obyiknovennogo (Aesculus Hippocastanum L.) semyan i ekstrakta suhogo na ih osnove : avtoref. dis. na soiskanie uchenoy stepeni kand. farmats. nauk : spets. 15.00.02 «Farmatsevticheskaya himiya i farmakognoziya». Moskva, 2009. 24 s.
11. Radionova V., Zbrozhek S., Shapovalova V., Shapovalov V. Study of the availability in circulation of medicines for women with addictive health disorders. Sciences of Europe. 2016. No.10. P. 50-58.
12. Concerning the importance of forensic and pharmaceutical researches to improve patients' accessibility to medicines / V. Shapovalov (Jr.), A. Gudzenko, L. Komar, A. Butko, V. Shapovalova, V. Shapovalov. Pharmacia. 2017. Vol. 65. No. 2. P. 23-29.
13. Shapovalova V.O. Stvorennia dytiachykh likarskykh form na osnovi vidomykh farmakolohichnykh substantsii : avtoref. dys. na zdobuttia nauk. stupenia doktora farmats. nauk.: spets. 15.00.04 «Orhanizatsiia ta ekonomika farmatsii», 15.00.01 «Tekhnolohiia likiv». Kharkiv, 1996. 46 s.

14. Spiridonov V.N., Prokopenko A.P., Kolesnikov D.G. Fitohimicheskoe izuchenie kashtana konskogo. Soobschenie 2. Vydelenie flavonoidov i saponina estsina iz plodov. Med. prom-st SSSR. 1963. No. 11. P. 17-20.
15. Yoshikawa M., Harada E., Murakami T. et al. Escins Ia, Ib, IIa, IIb and IIIa bioactive triterpene oligoglycosides from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L., their inhibitory effect ethanol absorbtion and hypoglycemic activity on glucose tolerance test. Chem. Pharm. Bull. 1994. Vol. 42. No. 6. P. 1357-1359.
16. Sokolov S.Ya., Zamotaev I.P. Spravochnik po lekarstvennyim rasteniyam (Fitoterapiya). Moskva. 1984. P. 125-127.
17. Lipidy semyan *Aesculus hippocastanum* L. / Derkach A. I., Komissarenko N. F., Zinchenko A. A. i dr. Farmakom. 1995. No. 4. P. 33-34.
18. Melnichuk O.P. Poluchenie estsina iz semyan konskogo kashtana: Tr. Leningradskogo himiko-farmatsevticheskogo instituta. Voprosyi farmakognozii. 1961. No. 12. P. 263-266.
19. Pat. 2665630 RF, A 61 R 9/14. Sposob polucheniya suhogo ekstrakta semyan kashtana konskogo obyiknovennogo. Ilin M. M., Sheychenko O. P., Azarkova A. F., Sheychenko V. I., Meshkov A. I., Shimanovskiy N. L., Fedotcheva T. A. URL: <https://findpatent.ru/patent/266/2665630.html>.
20. Zharova O.V., Shemeryankina T.B., Sokolskaya T.A., Savina A.A. Razrabotka tehnologii polucheniya suhogo ekstrakta semyan konskogo kashtana obyiknovennogo (*aesculus hippocastanum* l.) i ego standartizatsiya // Vestnik Rossiyskogo universiteta družhbyi narodov. Seriya: Meditsina, 2008. No. 7. P. 609-614. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-tehnologii-polucheniya-suhogo-ekstrakta-semyan-konskogo-kashtana-obyiknovennogo-aesculus-hippocastanum-l-i-ego>.
21. Yoshikawa M., Murakami T., Yamahara J. et al. Bioactive saponins glycosides. Horse Chestnut: Structures of Escins IIIb, IV, V and VI and isoescins Ia, Ib and V. Acylated Polyhydroxyoleanane Triterpene Oligoglycosides from the Seeds of Horse Chestnut Tree (*Aesculus hippocastanum* L. Hippocastanaceae). Chem. Pharm. Bull. 1998. Vol. 46. No. 11. P. 1764-1769.
22. Derkach A. I., Kotov A. G., Komissarenko S. N. Izuchenie nekotoryih biologicheski aktivnyih veschestv semyan *Aesculus hippocastanum* L. Farmakom. 1999. No. 5. P. 17-21.
23. Melaninyi semyan *Aesculus hippocastanum* L. / Komissarenko N.F., Derkach A.I., Chermenova G.V. i dr. Rastitelnyie resursyi. 1997. Vol. 33. No. 2. P. 56-58.