



Определение пространства дизайна и нормального рабочего диапазона параметров процесса получения очищенного экстракта конского каштана (*Aesculus hippocastanum* L.) семян

А. А. Полещук¹ , В. В. Сорокин¹ , И. Е. Каухова¹ , М. Д. Медведева¹ ,
Л. Ю. Александрова¹ , А. В. Сауц^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, вн. тер. г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

² Частное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский университет технологий управления и экономики» (ЧОУ ВО СПбТУиЭ). 190020, Россия, г. Санкт-Петербург, Лермонтовский проспект, д. 44, лит. А

✉ **Контактное лицо:** Полещук Анастасия Андреевна. **E-mail:** anastasiya.poleshchuk@spspu.ru

Резюме

Введение. Семена каштана конского являются перспективным источником тритерпеновых сапонинов – эсцинов (β-эсцина), обладающих веноотонизирующим, ангиопротекторным и противовоспалительным действием. Производство субстанции β-эсцина в России отсутствует, что определяет актуальность разработки воспроизводимой технологии получения очищенного экстракта конского каштана семян с высоким содержанием эсцинов.

Цель. Определение оптимальных параметров экстракции тритерпеновых сапонинов из конского каштана семян методом многофакторной оптимизации, разработка технологии очистки извлечения и установление нормального диапазона параметров процесса.

Материалы и методы. Оптимизацию процесса экстракции проводили по плану Бокса – Бенкена. Исследовали влияние концентрации спирта этилового, температуры, гидромодуля и длительности экстракции на выход суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин. Компонентный состав эсцинов устанавливали методом ВЭЖХ-МС с детекцией в режиме ESI+/ESI-. Количественное содержание сапонинов в извлечении определяли методом спектрофотометрии, β-эсцина в полученном продукте – методом ВЭЖХ.

Результаты и обсуждение. Построена квадратичная регрессионная модель процесса экстракции. Установлено, что определяющее влияние на выход сапонинов оказывают гидромодуль и концентрация экстрагента, а фактор температуры в принятых пределах статистически незначим. Оптимальные условия экстракции: концентрация спирта этилового – 49 %, температура – 45 °С, гидромодуль – 1:12, длительность процесса – 90 мин; прогнозируемый выход – 75,6 %. В соответствии с принципами ICH Q8(R2) определено пространство дизайна процесса (DS) ($Y \geq 65\%$) и нормальный рабочий диапазон (NOR). Методом ВЭЖХ-МС в очищенном экстракте идентифицированы 7 структурных групп эсцинов.

Заключение. Для процесса экстракции тритерпеновых сапонинов из конского каштана семян установлено пространство дизайна (Design Space) и нормальный рабочий диапазон в рамках концепции ICH Q8(R2) / QbD, что обеспечивает получение очищенного экстракта с воспроизводимыми показателями качества.

Ключевые слова: экстракция, конского каштана семена, тритерпеновые сапонины, эсцин, план Бокса – Бенкена, пространство дизайна, QbD

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. А. Полещук, В. В. Сорокин осуществляли постановку задачи. А. А. Полещук провела экспериментальную работу по экстрагированию и очистке экстракта. М. Д. Медведева провела экспериментальную работу по анализу полученного экстракта. Все авторы участвовали в обработке и анализе данных, обсуждении результатов и написании статьи.

Для цитирования: Полещук А. А., Сорокин В. В., Каухова И. Е., Медведева М. Д., Александрова Л. Ю., Сауц А. В. Определение пространства дизайна и нормального рабочего диапазона параметров процесса получения очищенного экстракта конского каштана (*Aesculus hippocastanum* L.) семян. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(3):107–118. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-3-2390>

Поступила в редакцию: 05.06.2026

Поступила после рецензирования: 13.07.2026

Принята к публикации: 14.08.2026

Determination of design space and normal operating range of process parameters to produce purified *Aesculus hippocastanum* L. seed extract

Anastasiya A. Poleshchuk¹✉ , Vladislav V. Sorokin¹ , Irina E. Kaukhova¹ ,
Mariya D. Medvedeva¹ , Lubov Yu. Aleksandrova¹ , Artur V. Sauts^{1,2} 

¹ Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University (SPCPU). 14A, Professora Popova str., Aptekarsky Ostrov Municipal Okrug, Saint Petersburg, 197022, Russia

² Saint Petersburg University of Management Technologies and Economics. 44A, Lermontovsky prospect, Saint Petersburg, 190020, Russia

✉ **Corresponding author:** Anastasiya A. Poleshchuk. **E-mail:** anastasiya.poleshchuk@spcpu.ru

Abstract

Introduction. *Aesculus hippocastanum* L. seeds are a promising source of triterpene saponins – escin (β -escin) possessing venotonic, angioprotective, and anti-inflammatory activities. The production of β -escin substance in Russia is currently absent, which determines the relevance of developing a reproducible technology for obtaining purified horse chestnut seed extract with a high escin content.

Aim. To determine the optimal extraction parameters of triterpene saponins from *Aesculus hippocastanum* L. seeds using multivariate optimization, to develop an extract purification procedure, and to establish the Normal Operating Range of process parameters.

Materials and methods. Extraction process optimization was performed according to a Box – Behnken design. The effects of ethanol concentration, temperature, solid-to-solvent ratio, and extraction time on the yield of total triterpene saponins expressed as β -escin were investigated. The chemical composition of the extract was determined by HPLC-MS with ESI+/ESI– detection. The quantitative content of saponins in the extract was determined by spectrophotometry; β -escin content in the purified extract was determined by HPLC.

Results and discussion. A quadratic regression model of the extraction process was developed. The solid-to-solvent ratio and ethanol concentration were identified as the primary factors affecting saponin yield, while temperature within the studied range was found to be statistically non-significant. The optimal extraction conditions were: ethanol concentration – 49 %, temperature – 45 °C, solid-to-solvent ratio – 1:12, extraction time – 90 min; the predicted yield was 75.6 %. In accordance with ICH Q8(R2) principles, the Design Space (DS) ($Y \geq 65$ %) and the Normal Operating Range (NOR) were established. Seven structural groups of escins were identified in the purified extract by HPLC-MS.

Conclusion. The Design Space and Normal Operating Range for the extraction process of triterpene saponins from *Aesculus hippocastanum* L. seeds were established within the ICH Q8(R2) / QbD framework, ensuring the production of purified extract with reproducible quality attributes.

Keywords: extraction, horse chestnut seeds, triterpene saponins, escin, Box – Behnken design, Design Space, QbD

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Anastasiya A. Poleshchuk and Vladislav V. Sorokin formulated the research objectives. Anastasiya A. Poleshchuk performed the experimental work on extraction and purification of the extract. Mariya D. Medvedeva performed the experimental work on analysis of the obtained extract. All authors participated in data processing and analysis, discussion of the results, and writing of the manuscript.

For citation: Poleshchuk A. A., Sorokin V. V., Kaukhova I. E., Medvedeva M. D., Aleksandrova L. Yu., Sauts A. V. Determination of design space and normal operating range of process parameters to produce purified *Aesculus hippocastanum* L. seed extract. *Drug development & registration*. 2026;15(3):107–118. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-3-2390>

Received: 05.06.2026

Revised: 13.07.2026

Accepted: 14.08.2026

ВВЕДЕНИЕ

Препараты на основе конского каштана семян экстракта (*Aesculus hippocastanum* L.) применяются в терапии хронических заболеваний вен, геморроя, а также в косметической и нутрицевтической промышленности [1–3]. Значительный фармакологический интерес представляет комплекс изомерных форм тритерпеновых сапонинов – эсцинов, среди которых наибольшую терапевтическую активность проявляет β-эсцин. Соединение обладает сложной полициклической амфифильной структурой и способно ингибировать лизосомальные гидролазы, снижая проницаемость сосудистых стенок и подавление медиаторов воспаления [4].

В Российской Федерации производство обогащенного эсцином экстракта не развито, а субстанции β-эсцина отсутствуют. Получение экстракта с высоким содержанием β-эсцина путем переработки отечественного лекарственного растительного сырья – конского каштана семян с учетом ареала его произрастания на территории России представляется технологически реализуемой и экономически целесообразной задачей.

Экстракция – сложный многофакторный процесс, зависящий от природы экстрагента и его концентрации, гидро модуля, температуры, длительности и способа интенсификации массопереноса [5–7]. Традиционный подход, заключающийся в проведении однофакторных экспериментов, не учитывает межфакторных взаимодействий и сопряжен с высоким риском ошибочной интерпретации результатов при значительных временных и материальных затратах. Современная фармацевтическая разработка в контексте концепции «качество через разработку» (QbD) предполагает применение методов планирования экспериментов (DoE), позволяющих с минимальным числом опытов построить математическую модель процесса и определить пространство дизайна (DS) – диапазон параметров, гарантирующий достижение заданного качества продукта и нормальные рабочие диапазоны параметров процесса (NOR). DS зависит от многих производственных факторов, таких как используемая технология, вид и параметры сырья и др. Данные о применении методологии QbD для оптимизации экстракции сапонинов из конского каштана семян и об определении рабочих диапазонов параметров процесса в доступной литературе ограничены, что затрудняет разработку воспроизводимой и масштабируемой технологии.

Цель исследования состояла в определении оптимальных параметров экстракции тритерпеновых сапонинов из конского каштана семян путем многофакторной оптимизации на основе плана Бокса – Бенкена, определении DS и NOR в соответствии с требованиями ICH Q8(R2), а также разработке схемы очистки полученного извлечения и установлении его состава методом ВЭЖХ-МС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись конского каштана семена, собранные в октябре 2024 г. в Санкт-Петербурге. Семена измельчали до 0,5–5,0 мм с помощью ножевой мельницы РМ-120 (ООО «ВИБРОТЕХНИК», Россия) и сушили в полочной сушилке с конвективным подводом тепла ПАХТ-СШ-СД (ООО «Тримбарт», Россия) до остаточной влажности не более 14 %. Влажность сырья измеряли на анализаторе влажности «Эвлас-2М» (ООО «ТД Сибагроприбор», Россия).

В качестве экстрагента использовали спирт этиловый различной концентрации, приготовленный из 96%-го спирта этилового класса «люкс» (АО «Аминосиб», Россия) и воды очищенной. Для определения массы использовали весы HCB 602 (Adam Equipment Co. Ltd., Великобритания). Экстракцию проводили при перемешивании верхнеприводной турбинной мешалкой MINISTAR 20 control (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Германия) при скорости вращения 300 об/мин и поддержании температуры с помощью циркуляционного термостата LT-200 (АО «ЛОИП», Россия). Концентрацию спирта этилового, гидро модуль, температуру и длительность экстракции варьировали в соответствии с разработанным планом эксперимента.

Для получения очищенного экстракта использовали петролейный эфир 40–70 (х.ч., ООО «АО РЕАХИМ», Россия) и бутанол-1 (х.ч., ООО «АО РЕАХИМ», Россия). Обезжиривание сырья петролейным эфиром проводили при перемешивании и нагревании до 45–50 °С в течение 1 ч при гидро модуле 1:1,7 с последующей декантацией эфира и сушкой сырья при 30 °С до полного удаления растворителя. Обезжиренное сырье экстрагировали в соответствии с матрицей плана эксперимента (таблица 3), после чего извлечение очищали от водорастворимых балластных веществ методом трехкратной жидкостной экстракции спиртом бутиловым (гидро модули 1:1,5; 1:1 и 1:0,5) при нагревании и перемешивании в течение 30 мин (мешалка магнитная ММ-5, Россия). Бутанольные извлечения объединяли и выпаривали с порционным добавлением воды на установке для простой перегонки. Водные извлечения сушили в полочной сушилке при 30 °С до остаточной влажности не более 3,5 %.

Количественное содержание суммы тритерпеновых сапонинов устанавливали спектрофотометрически в соответствии с валидированной методикой [8] с использованием спектрофотометра УФ-1800 (Shanghai Mapada Instruments Co., Ltd., Китай) и концентрированной серной кислоты (х.ч., АО «БЕКТОН», Россия).

Количественное содержание β-эсцина в готовом продукте определяли методом ВЭЖХ. Хроматографические условия: колонка Luna 5 µm C18(2) 100 Å, 250 × 4,6 мм, подвижная фаза: ацетонитрил (ос.ч., ООО «НПК Криохром», Россия) (40 %), раствор муравьиной кислоты (98–100 %, Agilent Technologies,

США) 0,1 % (60 %), изократический режим элюирования. Пробоподготовку проводили следующим образом: высушенный очищенный экстракт в количестве 10 мг растворяли в мерной колбе вместимостью 10,0 мл в спирте этиловом 96%-м на ультразвуковой бане «Сапфир-4,0-ТТЦ» (ООО «Сапфир», Россия), после чего фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Далее брали аликвоту 1,0 мл и помещали в мерную колбу на 10,0 мл, доводили до метки растворителем пробы (ацетонитрил – вода 50:50).

Качественный состав тритерпеновых сапонинов в очищенных экстрактах устанавливали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС). Анализ проводили на системе Thermo Scientific Accela (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенной диодно-матричным детектором (PDA) и тройным квадрупольным масс-спектрометром TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific, США) с ионизацией электро-распылением (ESI). Детекцию осуществляли одновременно в положительном (ESI+) и отрицательном (ESI-) режимах ионизации. Регистрацию масс-спектров – в режиме полного сканирования (Full Scan, Q1MS) в диапазоне m/z 50–1500 Да [9].

Хроматографическое разделение проводили на колонке ZORBAX Eclipse Plus C18 (150 × 4,6 мм, размер частиц 1,8 мкм; Agilent Technologies, США) при температуре термостата колонки 35 °С. Объем вводимой пробы составлял 10 мкл. В качестве подвижной фазы использовали: фаза А – 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде очищенной, фаза В – 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Элюирование проводили в градиентном режиме при скорости потока 1,0 мл/мин. Пробоподготовку осуществляли следующим образом: высушенный очищенный экстракт растворяли в спирте метиловом (ос.ч., ООО «Акваметрия», Россия) до концентрации 1 мг/мл, помещали в ультразвуковую баню на 1–2 мин до полного растворения, после чего фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Идентификацию β-эсцина осуществляли сравнением времен удерживания и значений молекулярных ионов испытуемого экстракта со стандартным образцом β-эсцина (ChemCruz). Критерием идентификации являлось совпадение времени удерживания в пределах $\Delta RT \leq 0,15$ мин и значений молекулярных ионов $[M-H]^-$ в пределах $\Delta m/z \leq 0,5$ Да. Идентификацию прочих структурных групп эсцинов проводили на основании значений молекулярных ионов в области отрицательной ионизации в соответствии с литературными данными [10]. Обработку хроматографических данных проводили с использованием программного обеспечения Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, США).

При планировании эксперимента применяли дизайн Бокса – Бенкена (BBD), включающий 24 основные и 3 центральные точки ($n = 27$). Выбор BBD обусловлен его эффективностью при изучении квадратичных эффектов и отсутствием угловых точек, что снижает риск нереализуемых экстремальных условий при масштабировании процесса.

Для получения упрощенной модели с улучшенными характеристиками применяли двунаправленную пошаговую регрессию (Stepwise): критерий включения p (вход) = 0,05; критерий исключения p (выход) = 0,10. Данный метод предпочтителен при малом объеме выборки ($n = 27$, число потенциальных предикторов $p = 14$, отношение $n/p < 2$). Робастность отбора предикторов дополнительно проверяли методом LASSO-регрессии с подбором параметра λ по LOO-кросс-валидации.

Оценка адекватности модели включала расчет коэффициента детерминации R^2 и скорректированного параметра R_{adj}^2 , критерия Lack of Fit, предсказательного показателя Q^2 , стандартную ошибку предсказания RMSE (LOO). Модель считали адекватной при выполнении следующих условий: Lack of Fit незначим ($p > 0,05$); $Q^2 > 0,50$; $R^2 - Q^2 < 0,20$. Статистически значимыми признавали результаты при $p < 0,05$.

Определение оптимума и пространства дизайна проводили аналитически из уравнения регрессии и в соответствии с принципами ICH Q8(R2). Исследуемые критические параметры (CPPs) и критический показатель качества (CQA) процесса экстракции приведены в таблице 1.

Таблица 1. CQA и CPPs

Table 1. CQA and CPPs

CPPs	CQA
Концентрация экстрагента (EtOH), %	Выход суммы тритерпеновых сапонинов, % ($Y \geq 65$ %)
Температура, °C	Total triterpene saponin yield, %
Гидромодуль	($Y \geq 65$ %)
Длительность, мин	
Extractant concentration (EtOH), %	
Temperature, °C	
Solid-to-solvent ratio	
Extraction time, min	

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Статистическую обработку данных осуществляли в среде Python 3.12 с использованием библиотек NumPy, SciPy и scikit-learn. Верификацию расчетов проводили с использованием программы JMP Pro 17.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экстракцию оптимизировали по плану Бокса – Бенкена, в соответствии с которым были получены 27 извлечений.

Предварительно авторами был выполнен скрининговый анализ факторов, влияющих на процесс экстракции, и их рациональных пределов варьирования. Факторы и уровни варьирования представлены в таблице 2. Порядок проведения опытов рандомизировали для снижения влияния неконтролируемых факторов. Матрица планирования эксперимента представлена в таблице 3.

Таблица 2. Факторы и уровни варьирования плана Бокса – Бенкена

Table 2. Factors and variation levels of the Box – Behnken Design

Фактор Factor	Обозначение Symbol	-1	0 (центр) 0 (center)	+1	Шаг варьирования Step size
Концентрация экстрагента (EtOH), % Extractant concentration (EtOH), %	X_1	45	65	85	20
Температура, °C Temperature, °C	X_2	30	45	60	15
Гидро модуль Solid-to-solvent ratio	X_3	5	8,5	12	3,5
Длительность, мин Extraction time, min	X_4	45	67,5	90	22,5

Примечание. X_1 – концентрация экстрагента, %; X_2 – температура, °C; X_3 – гидро модуль; X_4 – длительность экстракции, мин. Кодированные значения факторов рассчитывали по формуле $x_i = (X_i - X_{i0})/\Delta X_i$, где X_{i0} – центральный уровень, ΔX_i – шаг варьирования.

Note. X_1 – extractant concentration, %; X_2 – temperature, °C; X_3 – liquid-to-solid ratio; X_4 – extraction time, min. Coded factor values were calculated using the formula $x_i = (X_i - X_{i0})/\Delta X_i$, where X_{i0} – central level and ΔX_i – variation step.

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Определяли содержание сапонинов в экстрактах, полученных при установленных планом значениях факторов, и производили оценку выхода сапонинов по отношению к содержанию в сырье. Результаты исследования выхода сапонинов представлены в таблице 3. Выход сапонинов изменялся от 37,54 % (min) до 76,85 % (max).

Первичный анализ данных с включением 14 членов полной квадратичной модели показал, что большинство взаимодействий факторов статистически незначимы, а скорректированный коэффициент детерминации составил $R^2_{adj} = 0,743$ при $R^2 = 0,882$. Высокое значение R^2 при умеренном R^2_{adj} свидетельствует о переобученности полной модели. Для получения модели с улучшенными предсказательными характеристиками использовали метод двунаправлен-

ной пошаговой регрессии. В полученную модель вошли пять статистически значимых членов. Уравнение регрессии в кодированных переменных имеет вид:

$$Y = 56,478 - 8,422 \cdot X_1 - 5,298 \cdot X_1^2 + 10,310 \cdot X_3 + 5,435 \cdot X_4,$$

где

$$X_1 = (X_1 - 65)/20; X_3 = (X_3 - 8,5)/3,5; X_4 = (X_4 - 67,5)/22,5.$$

Таблица 3. Матрица планирования эксперимента и результаты исследования выхода сапонинов

Table 3. Experimental design matrix and saponin yield results

№	Уровень фактора Pattern	X_1 , %	X_2 , °C	X_3	X_4 , мин X_4 , min	Y, %
1	+0-0	85	45	5	67,5	37,75
2	+ -00	85	30	8,5	67,5	39,76
3	0	65	45	8,5	67,5	59,72
4	+0+0	85	45	12	67,5	54,03
5	-00+	45	45	8,5	90	64,56
6	00+-	65	45	12	45	49,75
7	0++0	65	60	12	67,5	69,17
8	0	65	45	8,5	67,5	56,08
9	00--	65	45	5	45	37,54
10	0-0-	65	30	8,5	45	48,55
11	00-+	65	45	5	90	49,74
12	-0-0	45	45	5	67,5	48,37
13	--00	45	30	8,5	67,5	56,19
14	-00-	45	45	8,5	45	59,56
15	0+0-	65	60	8,5	45	53,70
16	++00	85	60	8,5	67,5	46,34
17	+00-	85	45	8,5	45	40,20
18	0-+0	65	30	12	67,5	71,03
19	00++	65	45	12	90	76,85
20	-+00	45	60	8,5	67,5	64,46
21	0+0+	65	60	8,5	90	70,08
22	0+-0	65	60	5	67,5	43,45
23	0-0+	65	30	8,5	90	54,82
24	0--0	65	30	5	67,5	44,73
25	0	65	45	8,5	67,5	61,96
26	-0+0	45	45	12	67,5	64,47
27	+00+	85	45	8,5	90	38,47

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Анализ коэффициентов уравнения показывает, что наибольшее положительное влияние на выход сапонинов оказывает гидро модуль ($b_3 = +10,310$), так как увеличение объема экстрагента интенсифицирует диффузию сапонинов из сырья за счет роста градиента концентрации. Концентрация спирта этилового вошла в модель как линейным ($b_1 = -8,422$), так и квадратичным ($b_{11} = -5,298$) членами, описывая параболическую зависимость с максимумом при ~49 % спирта этилового. Длительность экстракции оказы-

вает умеренный положительный эффект ($b_4 = +5,435$). Температура не вошла в итоговое уравнение как статистически незначимый фактор ($p = 0,18$), что согласуется с литературными данными о термостабильности сапонинов и их хорошей растворимости в исследованном диапазоне температур 30–60 °C.

Таблица 4. Дисперсионный анализ (ANOVA) итоговой модели

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for the final model

Источник Source	SS	df	MS	F	p
Регрессия Regression	2668,24	4	667,06	23,574	<0,00001
Остаток Residual	622,52	22	28,30	–	–
Отсутствие подгонки Lack of fit	604,91	20	30,25	3,434	0,250
Ошибка Pure error	17,61	2	8,81	–	–
Итого Total	3290,77	26	–	–	–

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Полученные данные свидетельствуют об адекватности модели. Скорректированный коэффициент детерминации составил $R^2_{adj} = 0,776$, среднеквадратичная ошибка RMSE = 4,80 %. Предсказательная способность модели подтверждена скользящим контролем (LOO-кросс-валидация): $Q^2 = 0,701$, RMSE(LOO) = 6,04 %; разность $R^2 - Q^2 = 0,110 < 0,20$, что соответствует критериям отсутствия переобучения.

Нормальность распределения остатков регрессионной модели была проверена с использованием критерия Шапиро – Уилка ($W = 0,955$, $p = 0,284$).

Оптимальные условия и пространство дизайна определяли аналитически из уравнения регрессии. Вершина параболы по фактору «концентрация спирта этилового» соответствует значению $X_1 = 49$ %. Максимальные значения по гидромодулю и длительности соответствуют верхним границам плана. Таким образом, расчетные оптимальные условия экстракции следующие: концентрация спирта этилового – 49 %, температура – 45 °C, гидромодуль – 1:12, длительность процесса экстракции – 90 мин; прогнозируемый выход – 75,6 %.

На основании построенной модели в соответствии с принципами ICH Q8(R2) определено DS процесса экстракции (таблица 6, рисунок 1). В качестве критического показателя качества принят выход суммы тритерпеновых сапонинов $Y \geq 65$ %, установленный с учетом неопределенности модели (RMSE = 4,80 %) и технологического запаса воспроизводимости.

Таблица 5. Коэффициенты регрессионной модели

Table 5. Regression model coefficients

Член модели Parameter	Коэффициент Coefficient	Станд. отклонение Standard deviation	t	p
b_0 (свободный член) b_0 (intercept)	+56,478	1,348	41,89	<0,0001
b_1 (X_1 , концентрация этанола) b_1 (X_1 , ethanol concentration)	–8,422	1,255	–6,71	<0,0001
b_3 (X_3 , гидромодуль) b_3 (X_3 , solid-to-solvent ratio)	+10,310	1,255	+8,22	<0,0001
b_4 (X_4 , длительность) b_4 (X_4 , extraction time)	+5,435	1,255	+4,33	0,0003
b_{11} (X_1^2 , квадрат) b_{11} (X_1^2 , quadratic term)	–5,298	1,537	–3,45	0,0023

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Таблица 6. DS, PAR и NOR процесса экстракции тритерпеновых сапонинов из конского каштана (*Aesculus hippocastanum* L.) семян

Table 6. DS, PAR, and NOR for the extraction process of triterpene saponins from *Aesculus hippocastanum* L. seeds

Параметр процесса (CPP) Critical process parameter (CPP)	DS	PAR	NOR
Концентрация экстрагента (EtOH), % Extractant concentration (EtOH), %	38–62	38–62	43–57
Гидромодуль (SSR) (при $t = 90$ мин) Solid-to-solvent Ratio (SSR) (at $t = 90$ min)	$\geq 8,2$	8,2–12	9,5–12
Длительность экстракции, мин (при SSR = 12) Extraction time, min (at SSR = 12)	≥ 58	58–90	72–90
Температура экстракции, °C Extraction temperature, °C	30–60*	40–50	42–48
CQA: выход суммы TC, % CQA: total triterpene saponin yield, %	≥ 65	≥ 65	≥ 68

Примечание. * Фактор температуры в выбранном диапазоне статистически незначим ($p = 0,18$). PAR – Proven Acceptable Range (доказанный приемлемый диапазон); NOR – Normal Operating Range (нормальный рабочий диапазон); TC – тритерпеновые сапонины.

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

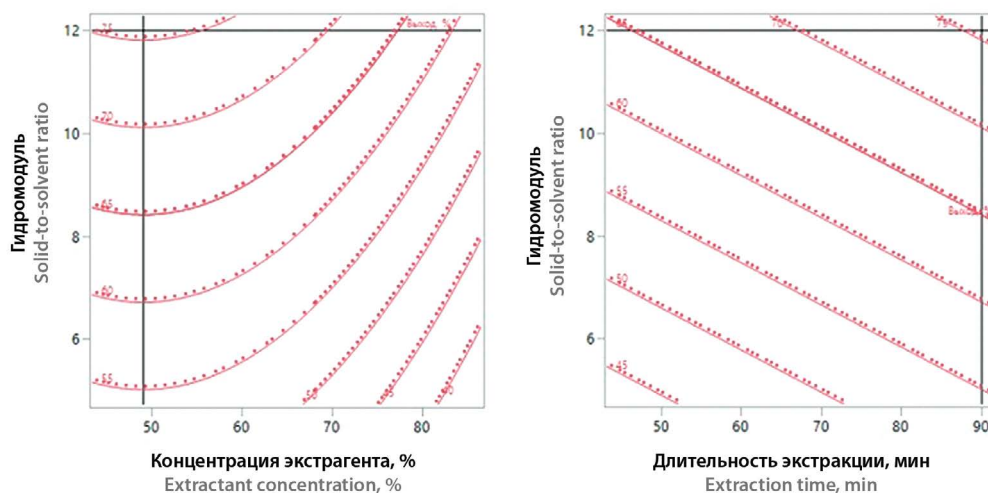


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 1. Контурные графики поверхности отклика

Figure 1. Response surface contour plots

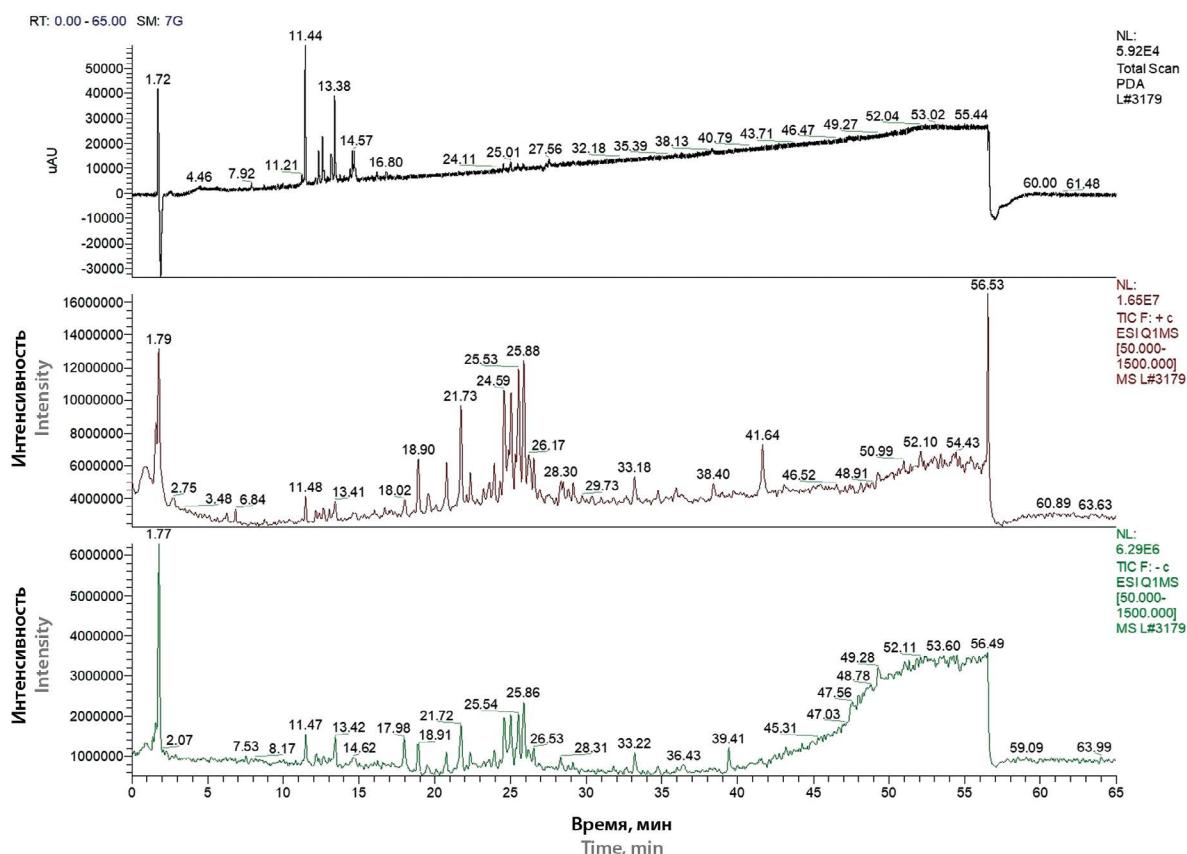


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 2. Полная хроматограмма экстракта, зарегистрированная с использованием детектора на диодной матрице (PDA) (сверху) и масс-спектрометра в режимах полного ионного тока (TIC) ESI+ (посередине) и ESI- (снизу)

Figure 2. Full chromatogram of the extract recorded with PDA (above) and MS detection in TIC ESI+ (middle) and ESI- (below) modes

Проведение процесса экстракции в пределах установленного пространства дизайна обеспечивает воспроизводимое получение экстракта с выходом суммы тритерпеновых сапонинов не менее 65 % в пересчете на β -эсцин и не требует дополнительного регуляторного согласования при изменении параметров процесса в указанных границах. Расчетные данные подтверждены экспериментально. Количественное содержание β -эсцина в очищенном экстракте составляло не менее $30,68 \pm 1,69$ %.

Для подтверждения подлинности и установления компонентного состава тритерпеновых сапонинов, содержащихся в очищенном экстракте, полученном при оптимальных условиях экстракции, выполнили его анализ методом ВЭЖХ-МС. На полной хроматограмме экстракта (рисунок 2), зарегистрированной с использованием детектора на диодной матрице (PDA) и масс-спектрометра в режимах полного ионного тока (TIC) ESI+ и ESI–, наблюдается сложный много-

компонентный профиль. Интенсивный отклик при $RT = 1,7–1,8$ мин обусловлен полярными балластными компонентами (органические кислоты, моносахариды), не удаленными полностью в ходе бутанольной очистки [11].

Идентификацию β -эсцина проводили путем сравнения хроматографических профилей испытуемого экстракта и стандартного образца β -эсцина по временам удерживания и значениям молекулярных ионов. На рисунке 3 представлены извлеченные ионные хроматограммы (XIC) по $m/z = 1128,50–1129,50$ в режиме ESI– в сопоставлении стандартного образца и экстракта. В обоих образцах зарегистрировано четыре основных пика, соответствующие четырем изомерным формам β -эсцина: эсцину Ia, эсцину Ib, изоэсцину Ia и изоэсцину Ib. Совпадение времен удерживания между стандартным образцом и экстрактом составило $\Delta RT \leq 0,15$ мин, что подтверждает подлинность идентифицированных компонентов.

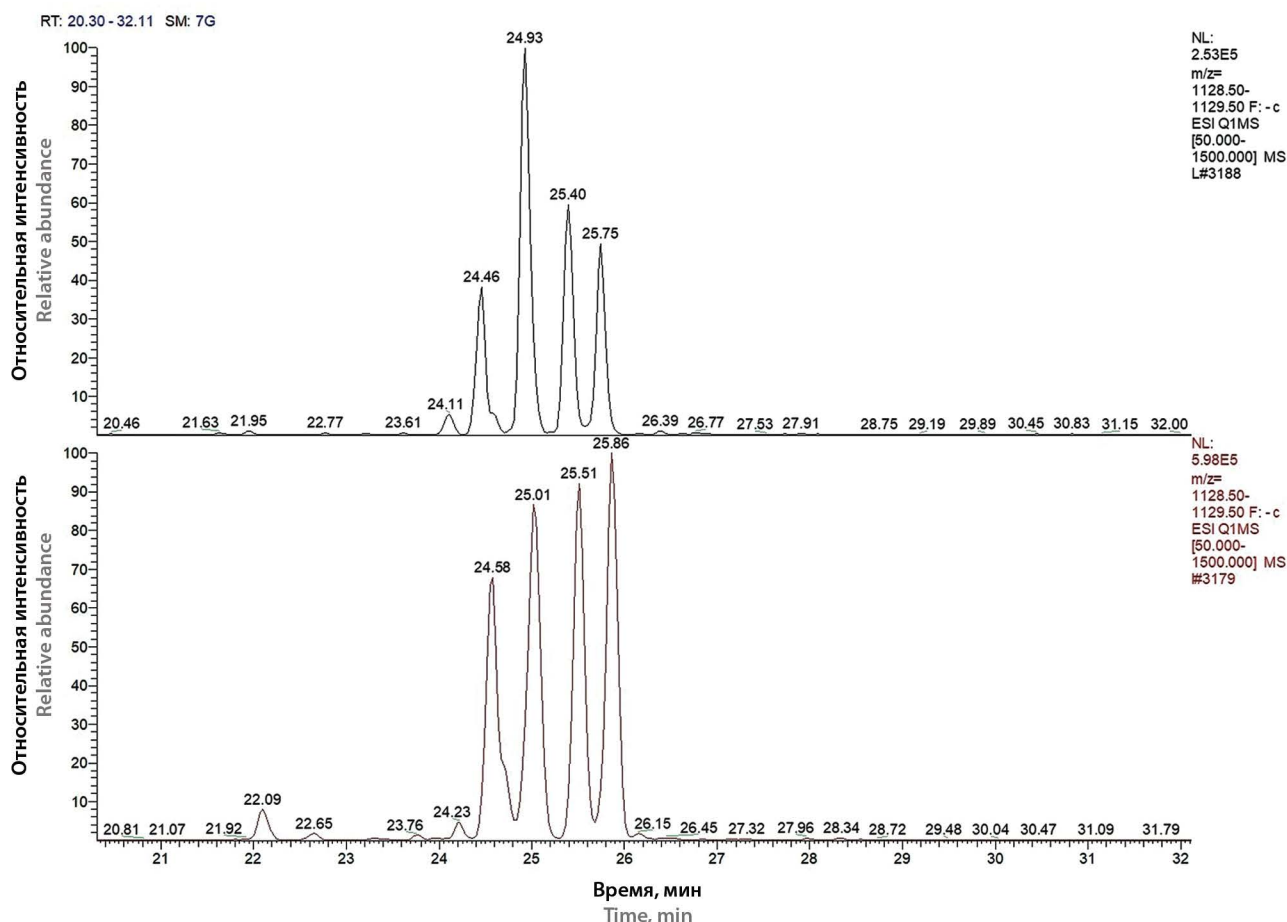


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 3. Извлеченные ионные хроматограммы ($m/z = 1128,50–1129,50$, режим ESI–) стандартного образца β -эсцина (сверху) и очищенного экстракта конского каштана (*Aesculus hippocastanum* L.) семян (снизу)

Figure 3. Extracted ion chromatograms ($m/z = 1128.50–1129.50$, ESI– mode) of β -escin reference standard (above) and purified *Aesculus hippocastanum* L. seed extract (below)

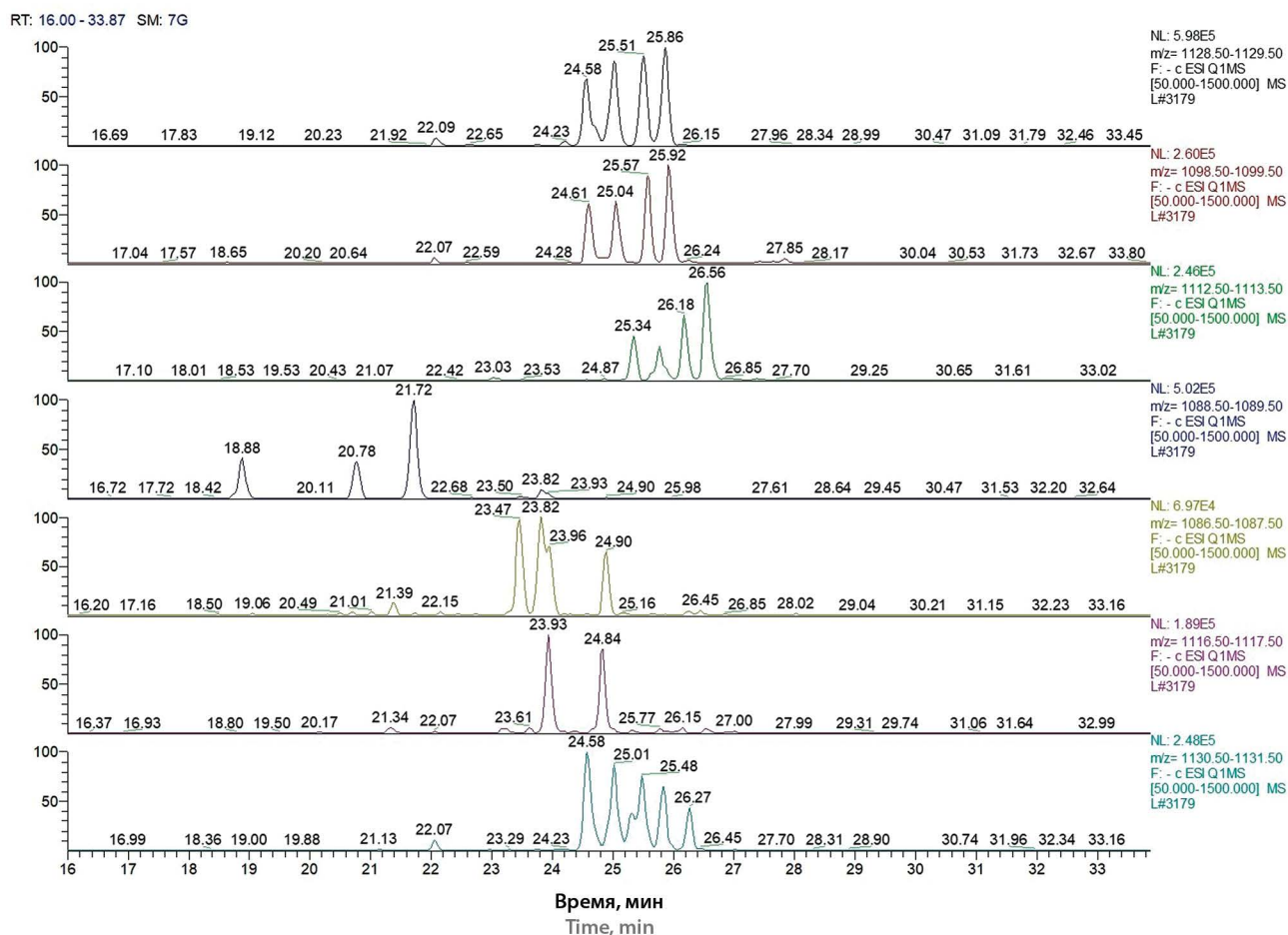


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 4. Сводные извлеченные ионные хроматограммы очищенного экстракта конского каштана (*Aesculus hippocastanum* L.) семян по семи группам тритерпеновых сапонинов в режиме ESI⁻ (RT = 16–34 мин):

I – эсцины I / изоэсцины I ($[M-H]^- = 1129 \text{ m/z}$); II – эсцины II / изоэсцины II ($[M-H]^- = 1099 \text{ m/z}$); III – эсцины III / изоэсцины III ($[M-H]^- = 1113 \text{ m/z}$); IV – эсцины IV / изоэсцины IV ($[M-H]^- = 1089 \text{ m/z}$); V – эсцины IVe–h ($[M-H]^- = 1087 \text{ m/z}$); VI – эсцины V / изоэсцины V ($[M-H]^- = 1117 \text{ m/z}$); VII – эсцины VI / изоэсцины VIa ($[M-H]^- = 1131 \text{ m/z}$)

Figure 4. Combined extracted ion chromatograms of purified *Aesculus hippocastanum* L. seed extract for seven triterpene saponin groups in ESI⁻ mode (RT = 16–34 min):

I – escins I / isoescins I ($[M-H]^- = 1129 \text{ m/z}$); II – escins II / isoescins II ($[M-H]^- = 1099 \text{ m/z}$); III – escins III / isoescins III ($[M-H]^- = 1113 \text{ m/z}$); IV – escins IV / isoescins IV ($[M-H]^- = 1089 \text{ m/z}$); V – escins IVe–h ($[M-H]^- = 1087 \text{ m/z}$); VI – escins V/isoescins V ($[M-H]^- = 1117 \text{ m/z}$); VII – escins VI / isoescins VIa ($[M-H]^- = 1131 \text{ m/z}$)

Наряду с основной группой эсцинов I в экстракте методом ХИС-анализа по теоретическим значениям молекулярных ионов $[M-H]^-$ идентифицированы компоненты шести дополнительных структурных групп тритерпеновых сапонинов. Сводный профиль ХИС-хроматограмм по семи молекулярным ионам представлен на рисунке 4. Перечень идентифицированных групп сапонинов, соответствующие значения молекулярных ионов и времена удерживания приведены в таблице 7.

Для подтверждения структурной идентификации компонентов группы I были записаны масс-спектры каждого из четырех пиков (рисунок 5). Во всех спек-

рах в режиме ESI⁻ регистрируется основной пик $[M-H]^- = 1129 \pm 0,5 \text{ m/z}$, а также фрагментный ион деструкции $m/z = 1099 \pm 0,5$, соответствующие стандартному образцу. Таким образом, методом ВЭЖХ-МС в очищенном экстракте конского каштана семян подтверждено наличие 7 структурных групп тритерпеновых сапонинов, характерных для данного вида лекарственного растительного сырья. Идентичность основного фармакологически активного компонента – β-эсцина (эсцины Ia/Ib и изоэсцины Ia/Ib) – доказана как по временам удерживания в сравнении со стандартным образцом ($\Delta RT \leq 0,15 \text{ мин}$), так и по значениям молекулярных ионов [12].

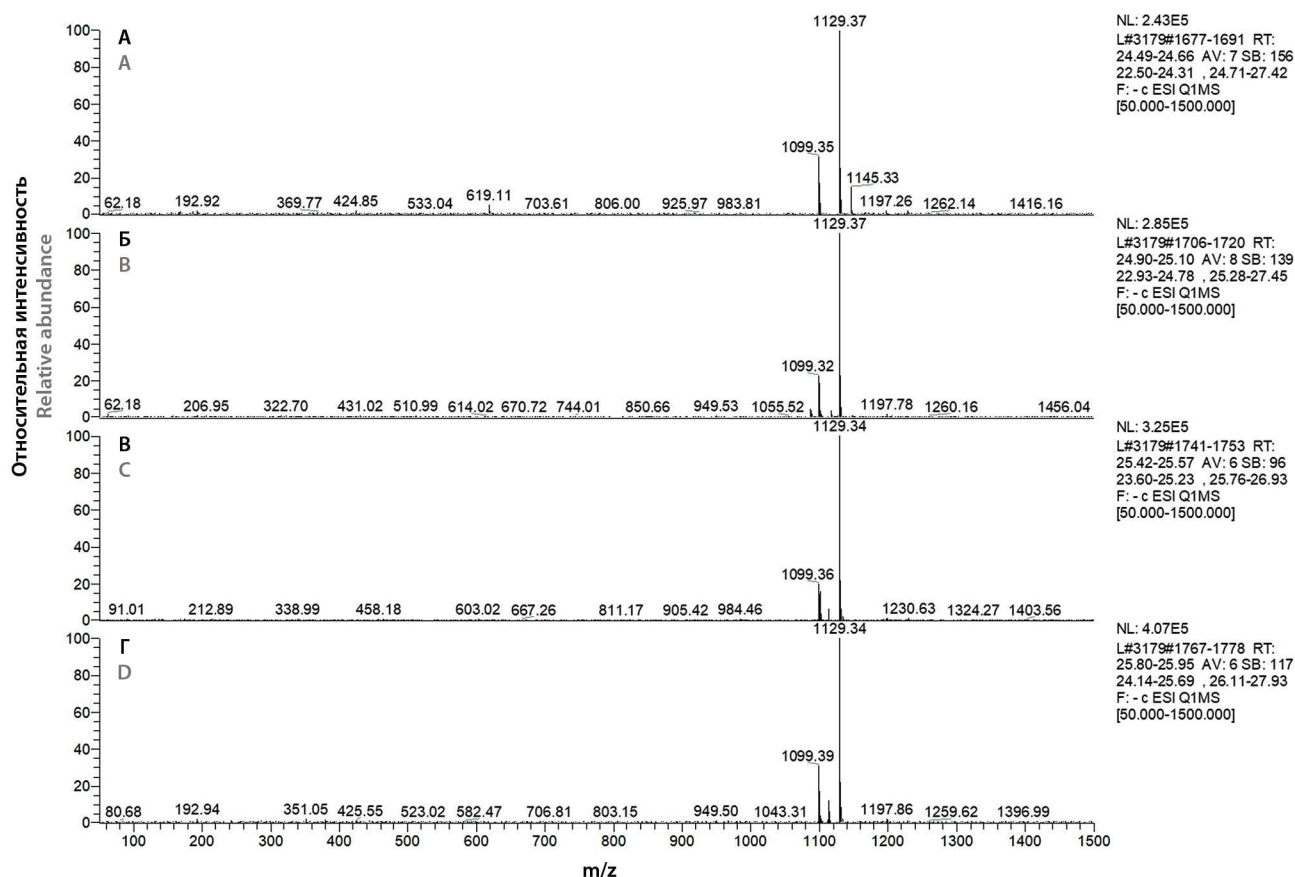


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 5. Масс-спектры ESI– четырех изомерных форм β-эсцина в очищенном экстракте конского каштана (*Aesculus hippocastanum* L.) семян:

A – RT = 24,49–24,66 мин; **Б** – RT = 24,90–25,10 мин; **В** – RT = 25,42–25,57 мин; **Г** – RT = 25,80–25,95 мин; стрелками обозначены молекулярный ион $[M-H]^-$ = 1129 m/z и характеристический фрагмент m/z = 1099

Figure 5. ESI– mass spectra of four isomeric forms of β-escin in purified *Aesculus hippocastanum* L. seed extract:

A – RT = 24.49–24.66 min; **B** – RT = 24.90–25.10 min; **C** – RT = 25.42–25.57 min; **D** – RT = 25.80–25.95 min; arrows indicate molecular ion $[M-H]^-$ = 1129 m/z and characteristic fragment ion m/z = 1099

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате многофакторной оптимизации процесса экстракции тритерпеновых сапонинов из конского каштана семян с применением плана Бокса – Бенкена ($n = 27$) построена адекватная регрессионная модель ($R^2_{adj} = 0,776$; $Q^2 = 0,701$; Lack of fit $p = 0,250$). Установлено определяющее влияние гидро модуля и концентрации спирта этилового на выход суммы тритерпеновых сапонинов. Показано, что фактор температуры в исследованном диапазоне 30–60 °C статистически незначим, однако за его пределами влияние может проявляться. Определены оптимальные условия экстракции: концентрация спирта этилового – 49 %, температура – 45 °C, гидро модуль – 1:12, длительность экстракции – 90 мин. Спрогнозированный выход составляет 75,6 %.

Для процесса экстракции тритерпеновых сапонинов из конского каштана семян установлены DS и NOR в рамках концепции ICH Q8(R2) / QbD. Показано, что в диапазоне концентраций спирта этилового 43–57 %, гидро модуля 9,5–12 и длительности 72–90 мин обеспечивается воспроизводимый выход суммы сапонинов с выходом по отношению к содержанию в сырье не менее 65 %. Впервые для отечественного сырья проведена идентификация 7 структурных групп эсцинов методом ВЭЖХ-МС в режиме ESI–. Было подтверждено наличие β-эсцина в виде четырех изомерных форм (эсцин Ia/Ib, изоэсцин Ia/Ib). Разработанные оптимальные условия экстракции и схема очистки (обезжиривание петролейным эфиром, трехкратная жидкостная экстракция бутанолом) могут быть использованы при создании нормативной и

производственной документации на очищенный экстракт конского каштана семян и субстанцию β-эсцина для фармацевтического применения. Установленное пространство дизайна и нормальный рабочий диапазон обеспечивают научное обоснование для создания регуляторного досье в формате ICH Q8(R2) и снижают объем валидационных работ при масштабировании процесса, а исследование создает научно-техническую базу для организации импортозамещающего производства β-эсцина в России.

Таблица 7. Идентифицированные группы тритерпеновых сапонинов в очищенном экстракте конского каштана (*Aesculus hippocastanum* L.) семян

Table 7. Identified groups of triterpene saponins in the purified *Aesculus hippocastanum* L. seed extract

№	Группа сапонинов Saponin group	[M-H] ⁺ факт., m/z [M-H] ⁺ found, m/z	RT основных пиков, мин RT of major peaks, min
1	Эсцин Ia, Ib; Изоэсцин Ia, Ib Escin Ia, Ib; Isoescsin Ia, Ib	1129,37 ± 0,5	24,58; 25,01; 25,51; 25,86
2	Эсцин IIa, IIb; Изоэсцин IIa, IIb Escin IIa, IIb; Isoescsin IIa, IIb	1099,35 ± 0,5	24,61; 25,04; 25,57; 25,92
3	Эсцин IIIa, IIIb; Изоэсцин IIIa, IIIb Escin IIIa, IIIb; Isoescsin IIIa, IIIb	1113,39 ± 0,5	25,34; 25,77; 26,18; 26,56
4	Эсцин IV / Изоэсцин IV Escin IV / Isoescsin IV	1089,30 ± 0,5	18,88; 20,78; 21,72
5	Эсцин IVe-h Escin IVe-h	1087,36 ± 0,5	23,47; 23,82; 23,96; 24,90
6	Эсцин V / Изоэсцин V Escin V / Isoescsin V	1117,37 ± 0,5	23,93; 24,84
7	Эсцин VI / Изоэсцин VIa Escin VI / Isoescsin VIa	1131,45 ± 0,5	24,58; 25,01; 25,48; 25,83; 26,27

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

ЛИТЕРАТУРА

- Gözcü S. *Aesculus hippocastanum* L. In: Gurağaç Dereli F.T., İlhan M., Belwal T., editors. Novel Drug Targets With Traditional Herbal Medicines. Cham: Springer; 2022. P. 23–36. https://doi.org/10.1007/978-3-031-07753-1_2
- Gallelli L. Escin: a review of its anti-edematous, anti-inflammatory, and venotonic properties. *Drug Design, Development and Therapy*. 2019;13:3425–3437. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S207720>

- Fazliev S., Tursunov K., Sharipov A., Xaydarov V., Normakhatov N., Rizaev K., Wang T., Aisa H. A. Escin's phytochemistry and pharmacy: biosynthesis, chemistry, synergism and novel activities. *Phytochemistry Reviews*. 2025;24:1345–1363. <https://doi.org/10.1007/s11101-024-09956-6>
- Вишнякова К.Р., Ханина М.А., Марданлы С.Г., Лапко Е.Ю., Родин А.П., Потемкина Н.М., Короткова Л.О. Исследование метаболома перикарпия *Aesculus hippocastanum* L. методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Известия ГТТУ. Медицина. Фармация*. 2025;1(21):32–39. <https://doi.org/10.51620/2687-1521-2025-1-21-32-39>
- Турманидзе Г.Н., Сорокин В.В., Степанов К.С., Игнатенко М.А. Совершенствование технологий выделения и очистки биологически активных веществ из растительного сырья. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):71–79. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1585>
- Уэйли А.К., Бурцева Е.В., Кулдыркаева Е.В., Новосад А.С., Бабак Н.Л., Жохова Е.В., Уэйли А.О., Гончаров М.Ю., Тернинко И.И., Яковлев Г.П. Способ получения тимохинона из жирного масла семян тмина черного (*Nigella sativa* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):29–40. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-29-40>
- Перес Б.А., Процюк А.П., Зеленцова А.Б., Каухова И.Е., Ароян М.В., Новикова Е.К. Разработка технологии получения фитосубстанции расторопши пятнистой плодов (*Silybum marianum* L.) в качестве компонента комплексной терапии заболеваний печени. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):101–110. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1582>
- Вишнякова К.Р., Смирнова Л.В., Короткова Л.О., Родин А.П., Потемкина Н.М., Ханина М.А. Методика количественного определения тритерпеновых сапонинов в перикарпии, семенах *Aesculus hippocastanum* L. и продуктах их первичной переработки. *Известия ГТТУ. Медицина. Фармация*. 2025;4(24):9–18. <https://doi.org/10.51620/2687-1521-2025-4-24-9-18>
- Kędzierski B., Kukula-Koch W., Wideliski J., Główniak K. Impact of harvest time of *Aesculus hippocastanum* seeds on the composition, antioxidant capacity and total phenolic content. *Industrial Crops and Products*. 2016;86:68–72. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.034>
- Chen J., Li W., Yang B., Guo X., Lee F. S.-C., Wang X. 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. *Analytica Chimica Acta*. 2007;596(2):273–280. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.011>
- Kapusta I., Janda B., Szajwaj B., Stochmal A., Piacente S., Pizza C., Franceschi F., Franz C., Oleszek W. Flavonoids in Horse Chestnut (*Aesculus hippocastanum*) Seeds and Powdered Waste Water Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(21):8485–8490. <https://doi.org/10.1021/jf071709t>
- Wang W.-W., Liu Z.-W., Sun Y.-Z., Liu L.-F. Comparison of Semen Aesculi species from different geographical origins and horse chestnut based on metabolomics and chemometrics analysis. *Phytochemical Analysis*. 2023;34(7):830–841. <https://doi.org/10.1002/pca.3212>

REFERENCES

1. Gözcü S. *Aesculus hippocastanum* L. In: Gürağaç Dereli F. T., İlhan M., Belwal T., editors. *Novel Drug Targets With Traditional Herbal Medicines*. Cham: Springer; 2022. P. 23–36. https://doi.org/10.1007/978-3-031-07753-1_2
2. Gallelli L. Escin: a review of its anti-edematous, anti-inflammatory, and venotonic properties. *Drug Design, Development and Therapy*. 2019;13:3425–3437. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S207720>
3. Fazliev S., Tursunov K., Sharipov A., Xaydarov V., Normakhatov N., Rizaev K., Wang T., Aisa H. A. Escin's phytochemistry and pharmacy: biosynthesis, chemistry, synergism and novel activities. *Phytochemistry Reviews*. 2025;24:1345–1363. <https://doi.org/10.1007/s11101-024-09956-6>
4. Vishnyakova K. R., Khanina M. A., Mardanly S. G., Lapko E. Yu., Rodin A. P., Potemkina N. M., Korotkova L. O. Study of the pericarp metabolome of *Aesculus hippocastanum* L. by gas chromatography with mass spectrometric detection. *Izvestiya GGTU. Meditsina, farmatsiya*. 2025;1(21):32–39. (In Russ.) <https://doi.org/10.51620/2687-1521-2025-1-21-32-39>
5. Turmanidze G. N., Sorokin V. V., Stepanov K. S., Ignatenko M. A. Improvement of technologies for isolation and purification of biologically active substances from plant raw materials. *Drug development & registration*. 2023;12(4):71–79. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1585>
6. Whaley A. K., Burtseva Y. V., Kuldyrkaeva E. V., Novosad A. S., Babak N. L., Zhokhova E. V., Whaley A. O., Goncharov M. Yu., Terninko I. I., Yakovlev G. P. A Method for the isolation of thymoquinone from black caraway seed oil (*Nigella sativa* L.). *Drug development & registration*. 2023;12(3):29–40. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-29-40>
7. Peres B. A., Procyuk A. P., Zelencova A. B., Kauhova I. E., Aroyan M. V., Novikova E. K. Development of Technology of Phytosubstantiation of *Silybum marianum* L. Fruits as a Component of Complex Therapy of Liver Diseases. *Drug development & registration*. 2023;12(4):101–110. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1582>
8. Vishnyakova K. R., Smirnova L. V., Korotkova L. O., Rodin A. P., Potemkina N. M., Khanina M. A. Method of quantitative determination of triterpene saponins in pericarpia, seeds of *Aesculus hippocastanum* L. and in the products of their primary processing. *Izvestiya GGTU. Medicina, farmatsiya*. 2025;4(24):9–18. (In Russ.) <https://doi.org/10.51620/2687-1521-2025-4-24-9-18>
9. Kędzierski B., Kukula-Koch W., Wideliski J., Głowniak K. Impact of harvest time of *Aesculus hippocastanum* seeds on the composition, antioxidant capacity and total phenolic content. *Industrial Crops and Products*. 2016;86:68–72. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.034>
10. Chen J., Li W., Yang B., Guo X., Lee F. S.-C., Wang X. 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. *Analytica Chimica Acta*. 2007;596(2):273–280. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.011>
11. Kapusta I., Janda B., Szajwaj B., Stochmal A., Piacente S., Pizza C., Franceschi F., Franz C., Oleszek W. Flavonoids in Horse Chestnut (*Aesculus hippocastanum*) Seeds and Powdered Waste Water Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(21):8485–8490. <https://doi.org/10.1021/jf071709t>
12. Wang W.-W., Liu Z.-W., Sun Y.-Z., Liu L.-F. Comparison of Semen Aesculi species from different geographical origins and horse chestnut based on metabolomics and chemometrics analysis. *Phytochemical Analysis*. 2023;34(7):830–841. <https://doi.org/10.1002/pca.3212>