Химия растительного сырья. 2026. №3. С. 180–191.
Khimiya rastitel'nogo syr'ya, 2026, no. 3, pp. 180–191.
DOI: 10.14258/jcprm.20260317699

УДК 615.074

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕЙКОАНТОЦИАНОВ В ЦВЕТКАХ КАШТАНА КОНСКОГО РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНОВ ПРОИЗРАСТАНИЯ

© ***А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева****

Воронежский государственный университет, ул. Студенческая, 3, Воронеж, 394006, Россия, trineevaov@mail.ru

Окислительный стресс играет ключевую роль в развитии сердечнососудистых, нейродегенеративных и метаболических заболеваний, что повышает интерес к природным антиоксидантам, таким как полифенолы. Лейкоантоцианы – малоизученные предшественники антоцианов – обладают выраженной антиоксидантной активностью и потенциально снижают риск атеросклероза, диабета и воспалений. Каштан конский (*Aesculus hippocastanum* L.) содержит эсцин и другие биоактивные вещества, применяемые в лечении венозной недостаточности. Цветки каштана, богатые полифенолами, используются в народной медицине, однако лейкоантоцианы в их составе остаются недостаточно исследованными.

Целью исследования являлась разработка и валидация методики количественного определения суммы лейкоантоцианов в цветках каштана.

Результаты. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы лейкоантоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид в цветках каштана конского методом спектрофотометрии. Полученные результаты валидации позволяют рекомендовать методику для количественного определения данных БАВ в цветках каштана конского. Установлено, что оптимальные условия экстракции включают использование 96% этанола, содержащего 5% хлористоводородной кислоты, при соотношении сырье : экстрагент 1 : 75 и времени экстракции 150 мин. Определено количественное содержание суммы лейкоантоцианов в цветках каштана конского различных регионов произрастания. Наибольшее содержание лейкоантоцианов отмечено в сырье из Петрозаводского городского округа (1.72±0.015%), вариабельность накопления данной группы БАВ в сырье (от 1.27 до 1.72%) в зависимости от совокупности эколого-географических факторов региона произрастания. Методом ТСХ в системе бутанол – уксусная кислота – вода (4 : 1 : 5) проведено разделение антоцианов в подкисленных спиртовых экстрактах из цветков каштана конского и выявлено три зоны с Rf 0.40; 0.60 и 0.77. ТСХ-профиль выделенных антоцианов для цветков каштана конского не показал различий по составу в зависимости от региона произрастания и заготовки сырья.

Выводы. Таким образом, проведенное исследование, являясь одним из ключевых этапов системного изучения цветков каштана конского, расширяет перспективы использования данного растительного сырья в качестве источника природных антиоксидантов.

Ключевые слова: лейкоантоцианы, цветки каштана конского, спектрофотометрия, валидация методики, количественное определение, ТСХ.

Для цитирования: Дунилин А.Д., Тринеева О.В. Разработка и валидация методики определения лейкоантоцианов в цветках каштана конского различных регионов произрастания // Химия растительного сырья. 2026. №3. С. 180–191. https://doi.org/10.14258/jcprm.20260317699.

Введение

Окислительный стресс играет ключевую роль в патогенезе широкого спектра заболеваний, включая сердечнососудистые, нейродегенеративные и метаболические нарушения. В связи с этим поиск природных антиоксидантов, способных модулировать процессы свободнорадикального окисления, представляет значительный интерес для современной фармации и медицины [1, 2]. Особое внимание уделяется растительным полифенолам, в частности антоцианам и их предшественникам – лейкоантоцианам, которые демонстрируют выраженную антиоксидантную активность при сравнительно низкой токсичности. Лейкоантоцианы, являясь бесцветными флаван-3,4-диолами, способны превращаться в антоцианидины под действием кислот или в результате ферментативных процессов, что определяет их значимость как потенциальных биологически

* Автор, с которым следует вести переписку.

активных соединений, обладающих антиоксидантным действием. Исследования подтверждают их роль в снижении риска развития атеросклероза, диабета и воспалительных процессов [3, 4]. Каштан конский обыкновенный (*Aesculus hippocastanum* L.), входящий в семейство конскокаштановые (*Hippocastanaceae* Burnett), является перспективным лекарственным растением, широко культивируемым в европейской части Российской Федерации. В официальной медицине используются семена каштана, которые содержат эсцин и другие биологически активные вещества, оказывающие противовоспалительное, венотонизирующее и противоотечное действие. Препараты на их основе применяются для лечения хронической венозной недостаточности (ХВН), посттромбофлебитического синдрома и лимфовенозной недостаточности, геморроя. В народной медицине находят применение и другие части растения. Например, цветки каштана используют в виде настоев и отваров при заболеваниях суставов, нарушениях микроциркуляции и как противовоспалительное средство. Несмотря на многочисленные исследования полифенольного состава цветков каштана конского, подтверждающие наличие широкого спектра фенольных соединений, лейкоантоцианы остаются наименее изученной группой биологически активных веществ в данном сырье. На данный момент существует небольшое количество статей, посвященных изучению антоцианов и проантоцианов в каштане конском [5–10]. Как известно, лейкоантоцианы являются восстановленными формами флавоноидов. Содержание последних в цветках каштана, как показали ранее проведенные исследования [11], значительно и составляет более 2%. Таким образом, изучение лейкоантоцианов в цветках каштана конского обыкновенного представляет значительный научный и практический интерес в связи с их потенциальной антиоксидантной активностью и возможностью применения в профилактике и терапии заболеваний, ассоциированных с окислительным стрессом. Оценки вариабельности накопления данной группы биологически активных веществ (БАВ) в цветках в зависимости от эколого-географических условий произрастания согласно литературным данным не обнаружено.

Цель исследования – разработка и валидация методики количественного определения суммы лейкоантоцианов в цветках каштана.

Экспериментальная часть

Объектом исследования являлись высушенные воздушно-теневым методом цветки каштана конского обыкновенного, заготовленные в Петрозаводском городском округе (61.84501 с.ш. 34.39094 в.д.), Ленинградской (59.75432 с.ш., 30.19781 в.д.), Московской (55.502041 с.ш., 37.800805 в.д.), Воронежской (51.834028 с.ш., 39.382854 в.д.), Волгоградской (48.58188 с.ш., 44.67911 в.д.) областях и Ставропольском крае (44.0755 с.ш., 43.01117 в.д.) во время массового цветения (май-июнь) в 2024 г. Относительная влажность сырья в зависимости от региона заготовки составляла не более 12%: Петрозаводский городской округ (11.6%), Ленинградская область (11.6%), Московская область (11.75%), Воронежская область (10.5%), Волгоградская область (9.65%), Ставропольский край (10.9%).

Выбор регионов заготовки сырья был обусловлен естественным ареалом культивирования данного растения, а также необходимостью оценки влияния совокупности природных факторов окружающей среды на содержание суммы лейкоантоцианов в сырье.

Для определения суммы лейкоантоцианов в форме собственно антоцианидинов адаптировали известную фармакопейную методику их количественного анализа методом дифференциальной спектрофотометрии в плодах черники обыкновенной ФС.2.5.0133 [12].

Измерения проводили на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия). Хроматографирование осуществляли в условиях, описанных в литературе [13–15]. Извлечения, полученные для количественного определения, наносили на пластину (ПТСХ-АФ-А) марки «Sorbfil» (Россия) – размер пластинки 10×10 см, в системах бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 1 : 5) восходящим способом. Пробы наносили микрошприцем МШ-10 (Агат, Россия), объем пробы – 10 мкл.

В работе использовали реактивы: кислота уксусная ледяная (АО «ЭКОС-1», Старая Купавна, Россия, «Х.Ч.»); н-бутанол (АО «ЭКОС-1», Старая Купавна, Россия «Ч.Д.А.»), кислота соляная (ООО «Сигма Тек», Химки, Россия «Х.Ч.), муравьиная кислота (АО «ВЕКТОН», Санкт-Петербург, Россия «Ч.Д.А.»)

Статистическая обработка данных проводилась согласно ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» [12].

Валидацию методики проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» по показателям специфичности, области линейности, предела обнаружения, предела количественного обнаружения, повторяемости, межлабораторной прецизионности [12].

Обсуждение результатов

Согласно литературным данным [16–19], для извлечения антоцианов из растительного сырья в качестве экстрагента чаще всего используют этиловый спирт различных концентраций, содержащий хлористоводородную кислоту (от 1 до 5%). При определении лейкоантоцианов используют их свойство переходить в извлечения в форме собственно антоцианидинов при нагревании с подкисленными спиртами. Результаты подбора оптимальной концентрации этилового спирта, подкисленного кислотой хлористоводородной до концентрации 1%, представлены в таблице 1.

Исходя из полученных данных, оптимальным экстрагентом можно считать спирт этиловый 96%, подкисленный до концентрации 1%.

Следующим этапом работы был подбор измельченности цветков каштана конского. Данный параметр является критически значимым, поскольку он определяет площадь контакта материала с экстрагентом и, как следствие, эффективность извлечения целевых соединений. Результаты представлены в таблице 2.

Установлено, что размер частиц сырья, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, обеспечивает больший выход суммы лейкоантоцианов.

Далее определяли влияние времени экстракции на выход изучаемой группы биологически активных веществ (БАВ) из цветков каштана конского, результаты представлены в таблице 3.

Таблица 1. Содержание лейкоантоцианов при экстракции этиловым спиртом разной концентрации

Концентрация этанола, %	Содержание лейкоантоцианов, %*
96	**0.39±0.02**
80	0.21±0.01
70	0.18±0.01
60	0.09±0.01
50	0.12±0.01
40	0.05±0.003

* степень измельченности – 2 мм; время экстракции – 60 мин; соотношение сырье : экстрагент – 1 : 50; концентрация хлористоводородной кислоты в спирте этиловом – 1%; кратность экстракции – 1.

Таблица 2. Содержание лейкоантоцианов при разной степени измельчения сырья

Диаметр отверстий сита, мм	Содержание лейкоантоцианов, %*
7	0.44±0.02
5	0.28±0.01
3	0.37±0.02
2	0.38±0.02
1	**0.51±0.03**
0.5	0.51±0.03

* концентрация этанола – 96%; время экстракции – 60 мин; соотношение сырье : экстрагент – 1 : 50; концентрация хлористоводородной кислоты в спирте этиловом – 1%; кратность экстракции – 1.

Таблица 3. Содержание лейкоантоцианов при разной продолжительности экстракции

Время экстракции, мин	Содержание лейкоантоцианов, %*
30	0.26±0.01
60	0.47±0.02
90	0.58±0.03
120	0.62±0.03
150	**0.68±0.03**
180	0.66±0.03
210	0.67±0.03

* концентрация этанола – 96%; степень измельченности – 1 мм; соотношение сырье : экстрагент – 1 : 50; концентрация хлористоводородной кислоты в спирте этиловом – 1%; кратность экстракции – 1.

Таким образом, оптимальное время экстракции для цветков каштана конского составило 150 мин. Дальнейшее увеличение времени приводило к незначительному уменьшению содержания, практически оставаясь постоянным.

Для определения оптимального соотношения «сырье : экстрагент» навески измельченных цветков каштана конского массой 1.0 г экстрагировали подкисленным 96% этанолом в различных объемах (10, 30, 50, 75 и 100 мл). Количественное содержание лейкоантоцианов в полученных экстрактах определяли спектрофотометрически, после чего проводили сравнительный анализ эффективности экстракции. Выявлено, что соотношение 1 : 75 является наиболее подходящим и способствует большему выходу лейкоантоцианов в извлечении (рис. 1). При использовании соотношения «сырье : экстрагент» 1 : 100 содержание лейкоантоцианов также оставалось высоким. Однако в промышленных масштабах нецелесообразен дополнительный расход экстрагента в условиях отсутствия роста выхода извлекаемой группы БАВ.

На следующем этапе вели подбор концентрации хлористоводородной кислоты в экстрагенте. Минимально достаточный уровень кислотности необходим для стабилизации лейкоантоцианов, предотвращая их окислительную деградацию и способствуя переходу в более устойчивые оксониевые формы. Таким образом, установлено, что минимально достаточная концентрация хлористоводородной кислоты в составе экстрагента составила 5% (рис. 2.).

На заключительном этапе разработки методики определения лейкоантоцианов в цветках каштана конского была подобрана оптимальная кратность экстракции. В результате проведенной серии экстракций было установлено, что максимальный выход суммы лейкоантоцианов составил 1.74% при однократной экстракции, двухкратная и трехкратная, при сохранении всех вышеподобранных параметров, показали 0.94 и 1.37% соответственно.

Таким образом, нами была разработана методика определения суммы лейкоантоцианов в цветках каштана конского. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 1.0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 75 мл спирта 96%, содержащего хлористоводородную кислоту 5%. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с точностью до ±0.01 г, затем присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 150 мин, затем охлаждают до комнатной температуры, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент спиртом 96%, содержащим хлористоводородную кислоту 5%. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (раствор А). 1.0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96%, содержащим хлористоводородную кислоту 5%, до метки и перемешивают (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 546±2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96%, содержащий хлористоводородную кислоту 5% (рис. 3).

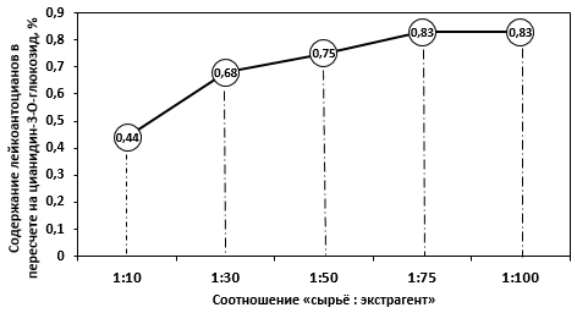


Рис. 1. Содержание лейкоантоцианов при различных соотношениях сырье : экстрагент (концентрация этанола – 96%; степень измельченности – 1 мм; концентрация хлористоводородной кислоты в спирте этиловом – 1%; кратность экстракции – 1; время экстракции – 150 мин)

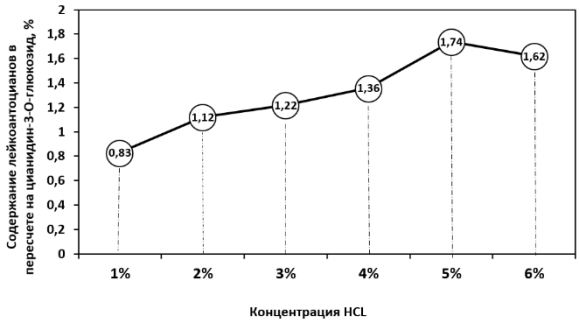


Рис. 2. Определение оптимальной концентрации хлористоводородной кислоты в экстрагенте (концентрация этанола – 96%; степень измельченности – 1 мм; соотношение «сырье : экстрагент» – 1 : 75; кратность экстракции – 1; время экстракции – 150 мин)

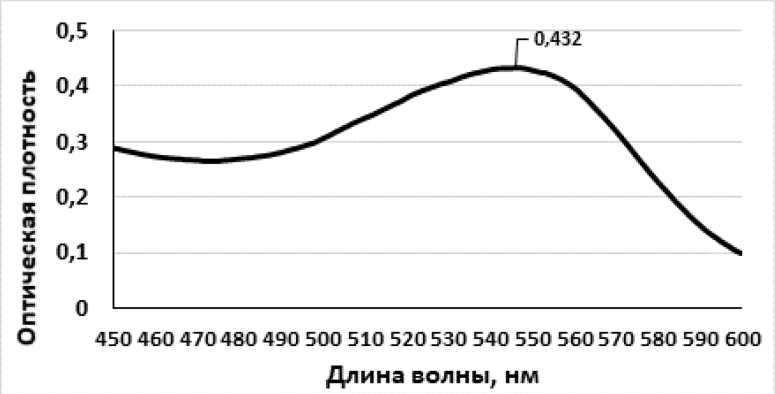


Рис. 3. Вид спектра поглощения извлечения из цветков каштана конского, полученного с применением подкисленного кислотой хлористоводородной спирта этилового 96%

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

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

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

Основные метрологические характеристики методики представлены в таблице 4. В качестве опорного значения при валидации принято содержание 1.73±0.015% в сырье.

Специфичность спектрофотометрической методики подтверждается тем, что аналитический сигнал при 546±2 нм соответствует максимуму поглощения антоцианов в подкисленном этиловом спирте (96%), в то время как спектр самого подкисленного растворителя не дает поглощения в этой области и регистрируется нулевое значение оптической плотности, совпадающее с «базовой линией». Таким образом, методику можно считать специфичной, поскольку аналитический сигнал в данной области, согласно литературным и экспериментальным данным, обусловлен исключительно антоцианами, что также подтверждается отсутствием спектра поглощения растворителя и сопутствующих веществ в данной спектральной области (рис. 4).

Зависимость оптической плотности от содержания суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид линейна, что отражено на рисунке 5 и подтверждается значением коэффициента корреляции, близким к 1.0. Аналитическая область методики (от 80 до 120% от номинального значения) соответствует от 0.41×10^{-5} до 2.48×10^{-5} г/мл антоциановых соединений в извлечении.

При определении показателя предела обнаружения установлено, что наименьшее количество определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено по разработанной методике, составило 0.01×10^{-5} г/мл. Предел количественного определения составляет 0.3×10^{-5} г/мл.

Повторяемость методики определялась в девяти повторениях одним исполнителем. Межлабораторную прецизионность подтверждали проведением измерения разными исполнителями в разные дни в девяти повторениях каждый. Результаты приведены в таблице 5. Относительные стандартные отклонения не превысили критериев приемлемости в 5%.

Таблица 4. Метрологические характеристики спектрофотометрического определения лейкоантоцианов в цветках каштана конского (P=95%, n = 9)

$X_{ср}$	S^2	S	$S_{xср}$	ΔX	$\Delta X_{ср}$	ε, %	$\varepsilon_{ср}$, %
1.48	0.00029	0.01696	0.00565	0.03917	0.01306	2.65	0.88

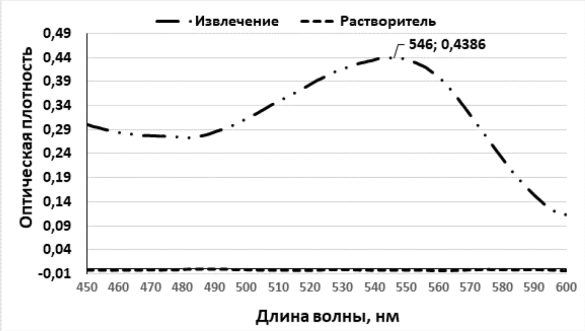


Рис. 4. Вид спектра поглощения извлечения из цветков каштана конского, относительно спектра растворителя – подкисленного спирта этилового 96%

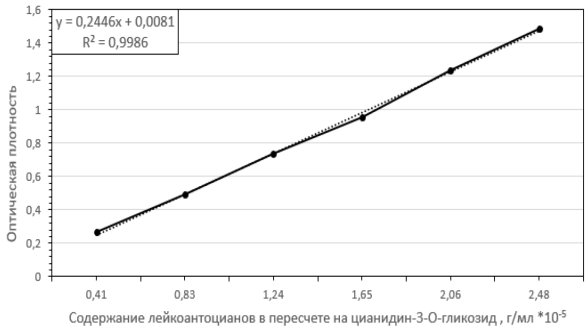


Рис. 5. График линейной зависимости оптической плотности от содержания антоцианов в извлечении в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид

Таблица 5. Валидационные характеристики методики определения антоцианов в цветках каштана конского

Характеристика	Статистическая характеристика	Результат	
Повторяемость	Проба	Содержание суммы лейкоантоцианов, %	
	1	1.46	
	2	1.46	
	3	1.46	
	4	1.47	
	5	1.47	
	6	1.48	
	7	1.49	
	8	1.5	
	9	1.5	
	Доверительный интервал (P=95%), %	1.48±0.013	
	Стандартное отклонение (SD), %	1.7	
	Относительное стандартное отклонение (RSD), %	1.15	
Межлабораторная прецизионность	Проба	Исследователь 1 (день 1)	Исследователь 2 (день 2)
	1	1.49	1.46
	2	1.50	1.46
	3	1.50	1.46
	4	1.50	1.47
	5	1.50	1.48
	6	1.51	1.48
	7	1.52	1.49
	8	1.53	1.49
	9	1.54	1.5
	Доверительный интервал (P=95%), %	1.49±0.008	
	Стандартное отклонение (SD), %	1.63	
	Относительное стандартное отклонение (RSD), %	1.09	
	Полученное значение критерия Фишера, вычисленное по результатам проведения испытаний разными исполнителями на разном оборудовании, должно быть меньше табличного значения $F_{практ} = S_1^2 / S_2^2 \leq F_{теор}$	$F_{практ} = S_1^2 / S_2^2 = 0.0002875 / 0.000275 = 1.05$ $F_{теор} = 3.44$ $F_{практ} \leq F_{теор}$	

Правильность методики считается подтвержденной, если свободный член уравнения линейной регрессии удовлетворяет условию:

$$b \leq \Delta b;\ \Delta b = t_{(0,05,\ n-2)} \times S_b,$$

где b – свободный член уравнения; Δb – доверительный интервал свободного члена; $t_{(0.05;\ n-2)}$ – коэффициент Стьюдента, где 0.05 – уровень значимости и n-2 число степеней свободы; S_b – стандартное отклонение свободного члена.

В нашем случае свободный член (b) = 0.0081, стандартное отклонение свободного члена (S_b) = 0.2366, исходя из этого доверительный интервал свободного члена (Δb) рассчитывается как 2.37×0.2366 и равен 0.5607. Поскольку выполняется условие 0.0081≤0.5607, можно сделать вывод, что методика является правильной, так как свободный член статистически незначимо отличается от нуля.

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

С использованием разработанной методики было определено содержание суммы лейкоантоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид при анализе цветков каштана конского различных регионов произрастания (табл. 6, рис. 6). Результаты спектрофотометрического анализа экстрактов цветков конского каштана выявили вариабельность содержания лейкоантоцианов в зависимости от региона заготовки. Наибольшее содержание лейкоантоцианов отмечено в цветках каштана, заготовленных в Петрозаводском городском округе (1.72±0.015%), характеризующемся относительно низкими среднегодовыми температурами (+3.8 °С), высоким уровнем осадков (756 мм/год) и минимальным количеством солнечных дней (63 дня/год) [20–22]. В то же время в Волгоградской области с более благоприятными климатическими условиями (158 солнечных дней/год) [20] содержание лейкоантоцианов оказалось существенно ниже (1.27%). Полученные данные позволяют предположить, что повышенное накопление лейкоантоцианов в растениях северных регионов представляет собой адаптивную реакцию на комплекс стрессовых факторов среды. В условиях пониженных температур и недостаточной инсоляции активируются механизмы синтеза фенольных соединений, выполняющих защитную функцию. Лейкоантоцианы, как предшественники антоцианов, вероятно, участвуют в системе антиоксидантной защиты, предохраняя растительные ткани от повреждений, вызванных окислительным стрессом.

Таблица 6. Содержание суммы лейкоантоцианов в цветках каштана конского различных регионов произрастания, в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид (%)

Регион произрастания	Сумма лейкоантоцианов, %
Петрозаводский городской округ	1.72±0.015
Ленинградская область	1.33±0.012
Московская область	1.27±0.011
Воронежская область	1.51±0.013
Волгоградская область	1.27±0.011
Ставропольский край	1.67±0.015

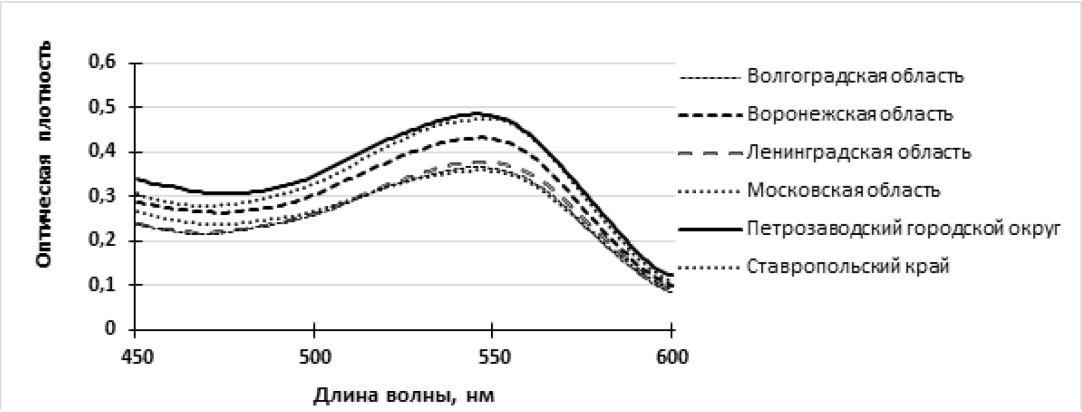


Рис. 6. Вид спектра поглощения продуктов окисления лейкоантоцианов в извлечении, полученном с применением подкисленного хлористоводородной кислотой спирта этилового 96%

Обнаруженная обратная корреляция между количеством солнечных дней и содержанием лейкоантоцианов может свидетельствовать о том, что в условиях недостаточной инсоляции растение компенсаторно усиливает синтез данных соединений. Это согласуется с известными литературными данными о роли вторичных метаболитов в адаптации растений к неблагоприятным условиям среды [23–29].

Полученные результаты согласуются с литературными данными [5–10], посвященными исследованию химического состава каштана конского обыкновенного.

На следующем этапе работы было проведено разделение лейкоантоцианов цветков каштана конского методом ТСХ. Сравнительный анализ литературных и экспериментальных данных показал, что оптимальное разделение лейкоантоцианов достигается в системе бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4 : 1 : 5), оптимальный объем пробы раствора, приготовленного для количественного определения, 10 мкл (табл. 7).

В данных условиях было детектировано три зоны (рис. 7), по окраске соответствующих группе антоциановых соединений с коэффициентами разделения (R) 2.24 и 2.23 соответственно. Данные рисунка 7 свидетельствуют также о том, что ТСХ-профиль антоциановых соединений в извлечениях из цветков каштана конского идентичен для всех изученных регионов произрастания растения. В остальных испытанных системах растворителей наблюдалось либо недостаточное разделение компонентов, либо полное отсутствие разделения исследуемой группы биологически активных веществ при том же объеме пробы (10 мкл).

Таблица 7. Результаты разделения лейкоантоцианов методом ТСХ в различных системах растворителей (на примере сырья, заготовленного в Воронежской области)

№ п/п	Элюент	Зоны на хроматограммах (Rf±0.03)			Окраска зоны адсорбции в видимом свете
1	*н*-Бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4 : 1 : 5)	0.40	0.60	0.77	Розовая
2	Муравьиная кислота безводная – вода – *н*-бутанол (16 : 19 : 65)	–	–	0.90	Зеленоватая
3	Вода – уксусная кислота (40 : 60)	Нет разделения			
4	Муравьиная кислота безводная – хлористоводородная кислота – вода (2 : 1 : 2)	Нет разделения			
5	*н*-Бутанол – раствор хлористоводородной кислоты (1 : 1)	0.36	–	–	Розовая

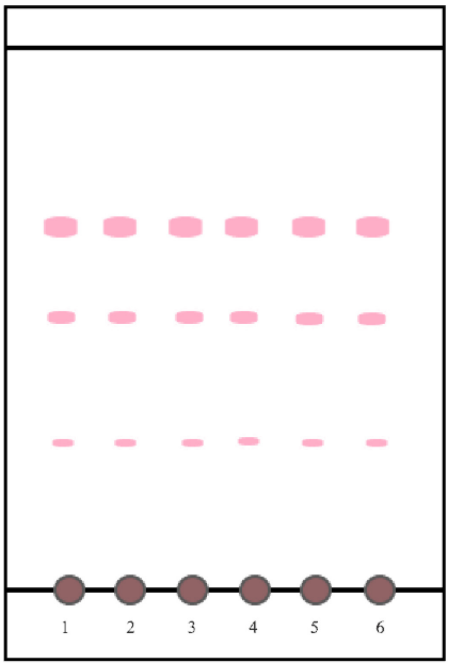


Рис. 7. ТСХ-схема разделения зон антоцианов подкисленных спиртовых извлечений из цветков каштана конского в системе бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4 : 1 : 5), объем пробы – 10 мкл (1 – Петрозаводский городской округ; 2 – Ленинградская область; 3 – Московская область; 4 – Воронежская область; 5 – Волгоградская область; 6 – Ставропольский край)

Выводы

Таким образом, разработана и валидирована методика количественного определения суммы лейкоантоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид в цветках каштана конского методом спектрофотометрии. Полученные результаты валидации позволяют рекомендовать методику для количественного определения данных БАВ в цветках каштана конского. Установлено, что оптимальные условия экстракции включают использование 96% этанола, содержащего 5% хлористоводородной кислоты, при соотношении сырье : экстрагент 1 : 75 и времени экстракции 150 мин. Определено количественное содержание суммы лейкоантоцианов в цветках каштана конского различных регионов произрастания. Наибольшее содержание лейкоантоцианов отмечено в сырье из Петрозаводского городского округа (1.72±0.015%), вариабельность накопления данной группы БАВ в сырье (от 1.27 до 1.72%) в зависимости от совокупности эколого-географических факторов региона произрастания. Методом ТСХ в системе бутанол – уксусная кислота – вода (4 : 1 : 5) проведено разделение антоцианов в подкисленных спиртовых экстрактах из цветков каштана конского и выявлено три зоны с Rf 0.40; 0.60 и 0.77. ТСХ-профиль выделенных антоцианов для цветков каштана конского не показал различий по составу в зависимости от региона произрастания и заготовки сырья. Таким образом, проведенное исследование, являясь одним из ключевых этапов системного изучения цветков каштана конского, расширяет перспективы использования данного растительного сырья в качестве источника природных антиоксидантов.

Финансирование
Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Воронежского государственного университета. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Конфликт интересов
Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ
Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы предоставите соответствующие ссылки на автора(ов), источник и Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Michalak M. Plant-Derived Antioxidants: Significance in Skin Health and the Ageing Process // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, no. 2. 585. https://doi.org/10.3390/ijms23020585.
2. Li S., Tan H.Y., Wang N., Zhang Z.J., Lao L., Wong C.W., Feng Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases // Int. J. Mol. Sci. 2015. Vol. 16, no. 11. Pp. 26087–26124. https://doi.org/10.3390/ijms161125942.
3. Mistry P.S., Chorawala M.R., Sivamaruthi B.S., Prajapati B.G., Kumar A., Chaiyasut C. The Role of Dietary Anthocyanins for Managing Diabetes Mellitus-Associated Complications // Curr Diabetes Rev. 2025. Vol. 21, no. 9. Pp. 76–99. https://doi.org/10.2174/0115733998322754240802063730.
4. Wallace T.C. Anthocyanins in cardiovascular disease // Adv. Nutr. 2011. Vol. 2, no. 1. Pp. 1–7. https://doi.org/10.3945/an.110.000042.
5. Santos-Buelga C., Kolodziej H., Treutter D. Procyanidin trimers possessing a doubly linked structure from Aesculus hippocastanum // Phytochemistry. 1995. Vol. 38. Pp. 499–504. https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00637-9.
6. Owczarek A., Kolodziejczyk-Czepas J., Woźniak-Serwata J., Magiera A., Kobiela N., Wąsowicz K., Olszewska M.A. Potential Activity Mechanisms of Aesculus hippocastanum Bark: Antioxidant Effects in Chemical and Biological In Vitro Models // Antioxidants. 2021. Vol. 10, no. 7. 995. https://doi.org/10.3390/antiox10070995.
7. Green A., Padilla-Gonzalez G.F., Phumthum M., Simmonds M.S.J., Sadgrove N.J. Comparative Metabolomics of Reproductive Organs in the Genus Aesculus (Sapindaceae) Reveals That Immature Fruits Are a Key Organ of Procyanidin Accumulation and Bioactivity // Plants. 2021. Vol. 10, no. 12. 2695. https://doi.org/10.3390/plants10122695.
8. Morimoto S., Nonaka G.I., Nishioka I. Tannins and related compounds. LIX. Aesculitannins, novel proanthocyanidins with doubly-bonded structures from Aesculus hippocastanum L. // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1987. Vol. 35, no. 12. Pp. 4717–4729. https://doi.org/10.1248/cpb.35.4717.
9. Owczarek A., Kołodziejczyk-Czepas J., Marczuk P., Siwek J., Wąsowicz K., Olszewska M.A. Bioactivity Potential of Aesculus hippocastanum L. Flower: Phytochemical Profile, Antiradical Capacity and Protective Effects on Human Plasma Components under Oxidative Nitrative Stress In Vitro // Pharmaceuticals. 2021. Vol. 14, no. 12. 1301. https://doi.org/10.3390/ph14121301.

10. Havelt T., Brettschneider S., Do X.T., Korte I., Kreyenschmidt J., Schmitz M. Sustainable Extraction and Characterisation of Bioactive Compounds from Horse Chestnut Seed Coats for the Development of Bio-Based Additives // Resources. 2019. Vol. 8, no. 2. 114. https://doi.org/10.3390/resources8020114.
11. Дунилин А.Д., Тринеева О.В., Ковалева Т.Ю. Разработка и валидация методики определения флавоноидов в цветках каштана конского различных регионов произрастания // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2024. Т. 23, №3. С. 224–234. https://doi.org/10.37903/vsgma.2024.3.28.
12. Государственная фармакопея Российской Федерации XV изд. М., 2023. Т. 1. URL: http://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/
13. Тринеева О.В. Изучение химического состава плодов облепихи крушиновидной, произрастающей на территории Центрального Черноземья // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2023. Т. 12, №1. С. 84–94. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-84-94.
14. Рудая М.А., Тринеева О.В., Сливкин А.И., Фомин С.М. ТСХ-профиль антоциановых соединений плодов облепихи крушиновидной различных сортов // II Международная научная конференция «Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства» по направлению «Метаболомика и качество жизни». М., 2019. С. 527–530.
15. Пугачева О.В., Тринеева О.В. Изучение ТСХ-профиля лейкоантоцианов листьев аронии Мичурина // XXV Международный Съезд ФИТОФАРМ 2024: сборник тезисов. СПб, 2024. С. 108–109.
16. Пугачева О.В., Тринеева О.В., Панова К.Е. Валидация методики количественного определения антоцианов в аронии Мичурина листьях // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2023. Т. 22, №4. С. 214–222. https://doi.org/10.37903/vsgma.2023.4.29.
17. Тринеева О.В., Пугачева О.В. Профиль биологически активных веществ листьев аронии мичурина, произрастающей в условиях Центрального Черноземья // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2024. Т. 13, №2. С. 48–58. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1715.
18. Тринеева О.В., Сливкин А.И., Самылина И.А., Казьмина М.А. Разработка методики количественного определения антоцианов в плодах облепихи крушиновидной // Фармация. 2015. №7. С. 9–13.
19. Куркин В.А., Рязанова Т.К., Куркина А.В., Егорова А.В. Разработка методики определения антоцианов в лекарственном растительном сырье // Фармация. 2014. №4. С. 17–20.
20. Количество солнечных дней. [Электронный ресурс]. URL: https://anyroad.ru/city/weather/sunnydays/санкт-петербург,ленинградская-область.
21. ФГБУ «Северо-Западное управление по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды». [Электронный ресурс]. URL: https://www.meteo.nw.ru.
22. Геоинформационная система «Метео измерения онлайн». [Электронный ресурс]. URL: https://thermo.karelia.ru/weather/w_precips.shtml.
23. Ramakrishna A., Ravishankar G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants // Plant Signal Behav. 2011. Vol. 6, no. 11. Pp. 1720–1731. https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613.
24. Hiruma K. Roles of Plant-Derived Secondary Metabolites during Interactions with Pathogenic and Beneficial Microbes under Conditions of Environmental Stress // Microorganisms. 2019. Vol. 7, no. 9. 362. https://doi.org/10.3390/microorganisms7090362.
25. Zhan X., Chen Z., Chen R., Shen C. Environmental and Genetic Factors Involved in Plant Protection-Associated Secondary Metabolite Biosynthesis Pathways // Front Plant Sci. 2022. Vol. 13. 877304. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.877304.
26. Isah T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production // Biol. Res. 2019. Vol. 52, no. 1. 39. https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3.
27. Chen D., Mubeen B., Hasnain A., Rizwan M., Adrees M., Naqvi S.A.H., Iqbal S., Kamran M., El-Sabrout A.M., Elansary H.O., Mahmoud E.A., Alaklabi A., Sathish M., Din G.M.U. Role of Promising Secondary Metabolites to Confer Resistance Against Environmental Stresses in Crop Plants: Current Scenario and Future Perspectives // Front Plant Sci. 2022. Vol. 13. 881032. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.881032.
28. Zhang L., Zhang Z., Cao J., Wang K., Qin L., Sun Y., Ju W., Qu C., Miao J. Extreme environmental adaptation mechanisms of Antarctic bryophytes are mainly the activation of antioxidants, secondary metabolites and photosynthetic pathways // BMC Plant Biol. 2023. Vol. 23, no. 1. 399. https://doi.org/10.1186/s12870-023-04366-w.
29. Labarrere B., Prinzing A., Dorey T., Chesneau E., Hennion F. Variations of Secondary Metabolites among Natural Populations of Sub-Antarctic Ranunculus Species Suggest Functional Redundancy and Versatility // Plants. 2019. Vol. 8, no. 7. 234. https://doi.org/10.3390/plants8070234.

Поступила в редакцию 28 июля 2025 г.

После переработки 20 ноября 2025 г.

Принята к публикации 20 мая 2026 г.

Dunilin A.D., Trineeva O.V.[*] DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF LEUCOANTHOCYANINS IN HORSE CHESTNUT FLOWERS FROM DIFFERENT GROWING REGIONS

Voronezh State University, st. Studencheskaya, 3, Voronezh, 394006, Russia, trineevaov@mail.ru

Oxidative stress plays a key role in the development of cardiovascular, neurodegenerative, and metabolic diseases, increasing interest in natural antioxidants such as polyphenols. Leukoanthocyanins, poorly studied precursors of anthocyanins, exhibit pronounced antioxidant activity and may potentially reduce the risk of atherosclerosis, diabetes, and inflammation. Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.), containing escin and other bioactive compounds used in the treatment of venous insufficiency, has been shown to contain leucoanthocyanin. Chestnut flower extracts, rich in polyphenolic compounds, are used in folk medicine, although the leucoanthocyans in their composition have not been sufficiently studied.

The aim of this study was to develop and validate a method for quantifying leucoanthocianins in chestnut flower samples.

Results. A method for the quantitative determination of the amount of leucoanthocyanins, in terms of cyanidin-3-O-glucoside, in horse chestnut flowers, using spectrophotometry has been developed and validated. The validation results allow us to recommend this method for quantifying leucoanthonocyanin content in horse chests. It was found that optimal extraction conditions include the use of 96% ethanol containing 5% hydrochloric acid at a ratio of raw material to extractant of 1 : 75 and an extraction time of 150 minutes. The quantitative content of leucocanthocyanin was determined in horsechestnuts from various growing areas. The highest content of leucoanthocyanins was noted in raw materials from Petrozavodsk (1.72±0.015%). The variability in the accumulation of this group of active substances ranged from 1.27 to 1.7 %. TLC analysis in a butanol-acetic acid-water (4 : 1 : 5) system revealed three zones with Rf values of 0.4, 0.6, and 0.8 for anthocyanin extracts from horse chestnut flowers. TLC profiles of isolated anthocyanins from different regions did not show significant differences in composition.

Conclusions. This research, which was one of the key steps in studying horse chestnut, expands the possibilities for using this plant as a natural antioxidant source.

Keywords: leucoanthocyanins, horse chest nut flower, spectrometric analysis, method validation, quantitative determination.

For citing: Dunilin A.D., Trineeva O.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2026, no. 3, pp. 180–191. (in Russ.). https://doi.org/10.14258/jcprm.20260317699.

References

1. Michalak M. *Int. J. Mol. Sci*., 2022, vol. 23, no. 2, 585. https://doi.org/10.3390/ijms23020585.
2. Li S., Tan H.Y., Wang N., Zhang Z.J., Lao L., Wong C.W., Feng Y. *Int. J. Mol. Sci*., 2015, vol. 16, no. 11, pp. 26087–26124. https://doi.org/10.3390/ijms161125942.
3. Mistry P.S., Chorawala M.R., Sivamaruthi B.S., Prajapati B.G., Kumar A., Chaiyasut C. *Curr Diabetes Rev*., 2025, vol. 21, no. 9, pp. 76–99. https://doi.org/10.2174/0115733998322754240802063730.
4. Wallace T.C. *Adv. Nutr*., 2011, vol. 2, no. 1, pp. 1–7. https://doi.org/10.3945/an.110.000042.
5. Santos-Buelga C., Kolodziej H., Treutter D. *Phytochemistry*, 1995, vol. 38, pp. 499–504. https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00637-9.
6. Owczarek A., Kolodziejczyk-Czepas J., Woźniak-Serwata J., Magiera A., Kobiela N., Wąsowicz K., Olszewska M.A. *Antioxidants*, 2021, vol. 10, no. 7, 995. https://doi.org/10.3390/antiox10070995.
7. Green A., Padilla-Gonzalez G.F., Phumthum M., Simmonds M.S.J., Sadgrove N.J. *Plants*, 2021, vol. 10, no. 12, 2695. https://doi.org/10.3390/plants10122695.
8. Morimoto S., Nonaka G.I., Nishioka I. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1987, vol. 35, no. 12, pp. 4717–4729. https://doi.org/10.1248/cpb.35.4717.
9. Owczarek A., Kołodziejczyk-Czepas J., Marczuk P., Siwek J., Wąsowicz K., Olszewska M.A. *Pharmaceuticals*, 2021, vol. 14, no. 12, 1301. https://doi.org/10.3390/ph14121301.
10. Havelt T., Brettschneider S., Do X.T., Korte I., Kreyenschmidt J., Schmitz M. *Resources*, 2019, vol. 8, no. 2, 114. https://doi.org/10.3390/resources8020114.
11. Dunilin A.D., Trineyeva O.V., Kovaleva T.Yu. *Vestnik Smolenskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii*, 2024, vol. 23, no. 3, pp. 224–234. https://doi.org/10.37903/vsgma.2024.3.28. (in Russ.).
12. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii, XV izd*. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 15th ed.]. Moscow, 2023, vol. 1. URL: http://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/ (in Russ.).
13. Trineyeva O.V. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*, 2023, vol. 12, no. 1, pp. 84–94. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-84-94. (in Russ.).
14. Rudaya M.A., Trineyeva O.V., Slivkin A.I., Fomin S.M. *II Mezhdunarodnaya nauchnaya konferentsiya «Rol' metabolomiki v sovershenstvovanii biotekhnologicheskikh sredstv proizvodstva» po napravleniyu «Metabolomika i kachestvo zhizni»*. [II International Scientific Conference "The Role of Metabolomics in Improving Biotechnological Production Methods," track: "Metabolomics and Quality of Life"]. Moscow, 2019, pp. 527–530. (in Russ.).
15. Pugacheva O.V., Trineyeva O.V. *XXV Mezhdunarodnyy S"yezd FITOFARM 2024: sbornik tezisov.* [XXV International Congress PHYTOPHARM 2024: Book of Abstracts]. St. Petersburg, 2024, pp. 108–109. (in Russ.).
16. Pugacheva O.V., Trineyeva O.V., Panova K.Ye. *Vestnik Smolenskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii*, 2023, vol. 22, no. 4, pp. 214–222. https://doi.org/10.37903/vsgma.2023.4.29. (in Russ.).
17. Trineyeva O.V., Pugacheva O.V. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*, 2024, vol. 13, no. 2, pp. 48–58. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1715. (in Russ.).

[*] Corresponding author.

18. Trineyeva O.V., Slivkin A.I., Samylina I.A., Kaz'mina M.A. *Farmatsiya*, 2015, no. 7, pp. 9–13. (in Russ.).
19. Kurkin V.A., Ryazanova T.K., Kurkina A.V., Yegorova A.V. *Farmatsiya*, 2014, no. 4, pp. 17–20. (in Russ.).
20. *Kolichestvo solnechnykh dney*. [Number of sunny days]. URL: https://anyroad.ru/city/weather/sunnydays/санкт-петербург,ленинградская-область. (in Russ.).
21. *FGBU «Severo-Zapadnoye upravleniye po gidrometeorologii i monitoringu okruzhayushchey sredy»*. [North-Western Administration for Hydrometeorology and Environmental Monitoring (FGBU)]. URL: https://www.meteo.nw.ru. (in Russ.).
22. *Geoinformatsionnaya sistema «Meteo izmereniya onlayn»*. ["Meteo Measurements Online" Geoinformation System]. URL: https://thermo.karelia.ru/weather/w_precips.shtml. (in Russ.).
23. Ramakrishna A., Ravishankar G.A. *Plant Signal Behav*., 2011, vol. 6, no. 11, pp. 1720–1731. https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613.
24. Hiruma K. *Microorganisms*, 2019, vol. 7, no. 9, 362. https://doi.org/10.3390/microorganisms7090362.
25. Zhan X., Chen Z., Chen R., Shen C. *Front Plant Sci*., 2022, vol. 13, 877304. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.877304.
26. Isah T. *Biol. Res*., 2019, vol. 52, no. 1, 39. https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3.
27. Chen D., Mubeen B., Hasnain A., Rizwan M., Adrees M., Naqvi S.A.H., Iqbal S., Kamran M., El-Sabrout A.M., Elansary H.O., Mahmoud E.A., Alaklabi A., Sathish M., Din G.M.U. *Front Plant Sci*., 2022, vol. 13, 881032. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.881032.
28. Zhang L., Zhang Z., Cao J., Wang K., Qin L., Sun Y., Ju W., Qu C., Miao J. *BMC Plant Biol*., 2023, vol. 23, no. 1, 399. https://doi.org/10.1186/s12870-023-04366-w.
29. Labarrere B., Prinzing A., Dorey T., Chesneau E., Hennion F. *Plants*, 2019, vol. 8, no. 7, 234. https://doi.org/10.3390/plants8070234.

Received July 28, 2025

Revised November 20, 2025

Accepted May 20, 2026

Сведения об авторах

Дунилин Александр Денисович – аспирант, ad.dunilin@gmail.com

Тринеева Ольга Валерьевна – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии, trineevaov@mail.ru

Information about authors

Dunilin Alexander Denisovich – Postgraduate student, ad.dunilin@gmail.com

Trineeva Olga Valeryevna – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor at the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, trineevaov@mail.ru