На правах рукописи

Дунилин Александр Денисович

Сравнительное фармакогностическое изучение цветков каштана конского различных регионов произрастания

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2026

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет»

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор **Тринеева Ольга Валерьевна**

Официальные оппоненты:
Сергунова Екатерина Вячеславовна – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Институт фармации имени А.П. Нелюбина, кафедра фармацевтического естествознания, профессор кафедры;

Шамилов Арнольд Алексеевич – доктор фармацевтических наук, доцент, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии и ботаники, и.о. заведующего кафедрой фармакогнозии и ботаники

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2026 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 443099, Российская Федерация, г. Самара, ул. Чапаевская, 89

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке по адресу: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171 и на сайте и на сайте (https://samsmu.ru/scientists/science/referats/2026/) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан « __ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 21.2.061.06,
кандидат фармацевтических наук, доцент **Жданова Алина Валитовна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одной из ключевых задач фармакогнозии является комплексное изучение уже известных лекарственных растений с целью расширения перечня используемых в медицине морфологических групп растительного сырья и выявления у них дополнительных, ранее не описанных фармакологических свойств.

В Российской Федерации (РФ) интерес к лекарственным растениям как к источнику сырья для производства лекарственных препаратов (ЛП) является стабильным, что согласуется с общемировыми тенденциями. Так, перспективным лекарственным растением является каштан конский обыкновенный (*Aesculus hippocastanum* L.) – растение рода конский каштан (*Aesculus* L.), семейства конскокаштановые (*Hippocastanaceae*), который широко используется в научной и народной медицине многих стран. Большое количество работ посвящено изучению химического состава и особенностей применения в медицине семян каштана конского. На фармацевтическом рынке РФ присутствует небольшое количество ЛП на основе семян каштана венотонизирующего действия: «Эскузан», «Веноплант», «Ангионорм» и «Конского каштана экстракт жидкий», действующим компонентом которых являются тритерпеновые сапонины. Биофлавоноиды флеботропного действия, представлены ЛП на основе рутина, троксерутина, диосмина и гесперидина. Последние производятся за рубежом и имеют достаточно высокую стоимость курсового лечения. В народной медицине наряду с семенами используются цветки каштана конского обыкновенного, являющиеся малоизученным лекарственным растительным сырьём (ЛРС) с точки зрения фитохимического состава и фармакологической активности. Однако в научной литературе имеются отдельные фрагментарные данные об уникальном комплексе флавоноидов и сапонинов, что делает цветки каштана конского обыкновенного также перспективным ЛРС для фармакогностического изучения с целью дальнейшей разработки отечественных эффективных и безопасных лекарственных растительных препаратов (ЛРП) флеботропного действия на основе ежегодно возобновляемого доступного сырья. Данные об особенностях регионального накопления биологически активных веществ (БАВ) в цветках данного растения отсутствуют. Для научного обоснования числовых значений показателей качества ЛРС, включаемых в нормативную документацию (НД), необходимо изучать их зависимость от эколого-географических условий произрастания во всех регионах РФ, где распространено производящее растение в диком виде или широко культивируется. Поэтому сравнительное фармакогностическое изучение цветков каштана конского различных регионов произрастания, как перспективного вида ЛРС в настоящее время следует считать актуальной задачей, решение которой будет способствовать расширению сырьевой базы лекарственных растений и созданию новых эффективных ЛРП.

Степень разработанности темы исследования. В Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) XV изд. присутствует фармакопейная статья (ФС) на семена каштана конского обыкновенного (ФС.2.5.0117).

Отечественные исследования внесли существенный вклад в изучение каштана конского. Работы Белова П.В. и Куркина В.А. (2020) были посвящены комплексному фармакогностическому исследованию различных органов растения как перспективного источника БАВ. Исследования Савченко Л.Н. и соавт. (2015) разрабатывали технологию и методы анализа жидкого экстракта из листьев и цветков каштана конского, обладающего противовоспалительной и венотонизирующей активностью. Значительный вклад в изучение биохимических особенностей внесли работы Жаровой О.Г. и соавт. (2008) по исследованию

липидного комплекса семян, а также исследования Филатовой А.В. и соавт. (2022) в области технологии выделения полисахаридов из оболочек плодов.

Зарубежные исследования расширили понимание биоразнообразия и биохимических особенностей каштана конского. Работа Chwil M. et al. (2014) детально описала микроморфологию трихом в цветках каштана конского, что имеет важное значение для разработки диагностических признаков сырья. Исследования Bielarska A.M. et al. (2022) продемонстрировали высокий антиоксидантный потенциал и содержание полифенолов в цветках и листьях растения. Многочисленные клинические исследования (Pittler M., Ernst E., 1998; Siebert U. et al., 2002) подтвердили эффективность экстракта семян каштана конского при хронической венозной недостаточности. Современные исследования Walas Ł. et al. (2025) посвящены изучению истории интродукции растения в Европе, а работы Hanaka A. et al. (2023) исследуют биохимические изменения при инфестации растения вредителями и болезнями.

Несмотря на значительный объем проведенных исследований, комплексные работы по стандартизации именно цветков каштана конского остаются фрагментарными. Отсутствуют унифицированные методики микроскопического анализа диагностических признаков сырья, недостаточно изучена вариабельность содержания основных групп БАВ в зависимости от региона произрастания, не разработаны современные валидированные методы анализа БАВ для данного вида сырья и лекарственных форм (ЛФ) на его основе.

Цель исследования – сравнительное фармакогностическое изучение и разработка подходов к стандартизации цветков каштана конского различных регионов произрастания, как нового вида лекарственного растительного сырья – перспективного источника биологически активных веществ.

Задачи исследования:

1. Провести анатомо-морфологическое исследование и выявить различными методами микроскопического анализа диагностически значимые признаки цветков каштана конского;
2. Разработать нормативы товароведческих показателей качества цветков каштана конского обыкновенного;
3. Провести оценку безопасности применения цветков каштана конского по способности к накоплению экотоксикантов;
4. Разработать и валидировать методики количественного определения суммы флавоноидов и сапонинов в цветках каштана конского обыкновенного и жидких водно-спиртовых лекарственных форм на его основе как целевых групп биологически активных веществ;
5. С применением комплекса методов физико-химического анализа изучить региональную вариабельность профиля биологически активных веществ различных групп в сырье;
6. Определить целесообразные направления дальнейшей разработки лекарственных растительных препаратов на основе цветков каштана конского по результатам оценки различных видов фармакологической активности *in silico* и *in vitro*;
7. Получить и стандартизировать лабораторные образцы жидких водных и спиртосодержащих лекарственных форм на основе цветков каштана конского;
8. На основе проведенных исследований разработать нормы качества и подготовить проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья – «Конского каштана обыкновенного цветки».

Научная новизна. По результатам проведенных исследований установлена перспективность использования цветков каштана конского как источника БАВ. Впервые было проведено сравнительное фармакогностическое исследование цветков каштана конского

различных регионов произрастания, позволяющее установить широту варьирования БАВ, оптимальные сроки заготовки ЛРС с максимальным содержанием БАВ. Впервые методами капиллярного электрофореза (КЭ), газовой хроматографии (ГХ/МС), тонкослойной хроматографии (ТСХ), спектрофотометрии (СФМ), инфракрасной спектроскопии (ИКС) исследован состав БАВ (аминокислоты, органические кислоты, фенольные соединения, тритерпеновые сапонины, стерины и сахара) и отслежена региональная динамика их накопления. Установлены нормативы числовых показателей качества ЛРС. Изучены морфолого-анатомические признаки подлинности сырья, в т.ч. впервые с применением растровой электронной микроскопии.

Установлены особенности накопления тяжелых металлов, а также содержание радионуклидов и остаточных пестицидов в цветках каштана конского. Установлено, что изученные образцы экологически безопасны и могут быть рекомендованы для массовой заготовки.

Впервые разработаны и валидированы методики определения целевых групп БАВ – флавоноидов и тритерпеновых сапонинов (ТС), в цветках каштана конского и жидких лекарственных формах (ЖЛФ) на его основе.

Впервые разработаны и валидированы методики определения лейкоантоцианов и антиокислительной активности (АОА) для цветков каштана конского. Новизна проведенных исследований подтверждена патентом РФ на изобретение № 2862904 от 26.05.2026 «Способ определения антиокислительной активности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов методом обратной цериметрии». Методом компьютерного моделирования *in silico* определены основные виды фармакологической активности и побочных действий комплекса БАВ цветков. АОА извлечений на основе цветков каштана подтверждена комплексом титриметрических и спектрофотометрических методов. С использованием тест-системы инфузорий *Paramecium caudatum* в тесте «функциональная нагрузка» впервые установлено, что настой цветков каштана *in vitro* проявлял мембранопротекторную активность. В тесте «Острая токсичность» подтверждена безопасность настоя цветков. Полученные данные по оценке потенциальных видов фармакологической активности позволяют предложить данное ЛРС для разработки препаратов на его основе, обладающих флеботропной, антиоксидантной и мембранопротекторной активностью.

Теоретическая и практическая значимость. Экспериментальный материал, представленный в работе, содержит новые данные о химическом составе БАВ в цветках каштана конского и его эколого-географической изменчивости на территории Европейской части РФ. Исследования подтвердили перспективность использования цветков наравне с семенами в качестве источника ТС и флавоноидов. В результате изучения морфолого – анатомических признаков, товароведческого и фитохимического анализа установлены основные параметры подлинности и показатели, характеризующие доброкачественность растительного сырья. Даны рекомендации по заготовке и срокам хранения сырья. Подготовлен проект ФС «Конского каштана обыкновенного цветки» для ГФ РФ, принятый на рассмотрение в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ.

Методология и методы исследования. Теоретическую основу исследования составили труды российских (Белов П.В., Куркин В.А., Жарова О.Г., Саушкина А.С., Савченко Л.Н., Постоюк Н.А.) и зарубежных (Bielarska AM., Chwil M., Dudek-Makuch M., Owczarek A., Zhang Z., Wang Y.) ученых, которые были взяты за основу при проведении комплексного фармакогностического изучения цветков каштана конского. Методология исследования

включала в себя проведение морфолого-анатомического, всестороннего химического, фармакологического изучения цветков каштана конского различных регионов произрастания. В процессе выполнения диссертационной работы использовались методы сравнительного и документального анализа, а также комплекс физико-химических методов и технологических испытаний, методы математической статистики и обработки результатов анализа.

Личный вклад автора. При непосредственном участии автора были определены цели и задачи исследования, автором проведен анализ российской и зарубежной научной литературы. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов исследования, написании публикаций по теме исследования. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от постановки задач, их теоретической и практической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях, докладах и внедрения их в практику. Диссертация и автореферат написаны автором лично.

Достоверность научных положений и выводов. Оценка уровня достоверности полученных результатов и выводов определяется большим объемом проанализированной отечественной и иностранной информационной базы, проведением достаточного количества экспериментальных исследований с использованием современных физико-химических методов анализа. В работе использовалось сертифицированное оборудование, на которое выданы действующие свидетельства о поверке.

Апробация работы. Основные результаты исследования доложены на конференциях различного уровня: IX Международная научно-методическая конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (Воронеж, 2023 г.), Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» (Пятигорск, 2024 – 2026 г.), II-IV Региональные научно-практические конференции «Современные аспекты обращения лекарственных средств» (Воронеж, 2024 – 2026 г.), XXV - XXVI Международные съезды «ФИТОФАРМ» (Санкт-Петербург, 2024 – 2025 г.), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 175-летию открытия явления ионного обмена и 25-летию журнала «Сорбционные и хроматографические процессы» (Воронеж, 2025 г.). Апробация результатов диссертации состоялась на межкафедральном заседании (протокол № 1506 – 17) от 30.06.2026 г.).

Внедрение результатов исследования. Полученные в ходе диссертационного исследования данные сравнительного фармакогностического изучения цветков каштана конского различных регионов произрастания использованы при разработке проекта ФС «Конского каштана обыкновенного цветки» для ГФ РФ. Материалы диссертационного исследования рекомендованы к внедрению для проведения учебных занятий при реализации дисциплины «Фармакогнозия» и учебной практики по фармакогнозии для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация» (ВО); дисциплины «Фармакогнозия» и производственной практики по фармакогнозии для ординаторов, обучающихся по специальности 33.08.03 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия», а также при реализации МДК «Лекарственные растительные препараты» для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 «Фармация» (СПО), при проведении научно-исследовательских работ по стандартизации и оценке качества ЛРС (акт внедрения №1506-89 от 26.01.2026), также при проведении занятий на курсах повышения квалификации провизоров и фармацевтов по ДПО «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» по тематике фармакогностического анализа и

проблем идентификации нефармакопейных морфологических частей фармакопейных видов лекарственных растений, произрастающих на территории Центрального Черноземья (акт внедрения №1500-11 от 26.01.2026) на фармацевтическом факультете Воронежского госуниверситета, а также для проведения учебных занятий бакалавров по направлению подготовки 35.03.01 «Лесное дело», профиль – Защита леса и охотоведение на лесном факультете Воронежского государственного лесотехнического университета (акт внедрения №3 от 24.11.2025). Разработана и утверждена инструкция по сбору и сушке каштана конского обыкновенного цветков для работы ботанического сада им. проф. Б.М. Козо-Полянского ВГУ.

Связь задач исследования с планами научных работ. Диссертационная работа была выполнена в рамках плана и в соответствии с тематикой научно-исследовательской работы кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертационной работы соответствуют формуле специальности, 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно пункту 5, 6 и 7 паспорта.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования анатомо-диагностических признаков цветков каштана конского обыкновенного с применением различных методов микроскопического анализа;
2. Результаты оценки накопления экотоксикантов цветками каштана конского обыкновенного;
3. Результаты всестороннего определения различных групп БАВ в цветках каштана конского различных регионов произрастания с помощью современных физико-химических методов;
4. Результаты разработки и валидации методик определения фенольных соединений (флавоноидов и лейкоантоцианов) и тритерпеновых сапонинов в цветках;
5. Результаты стандартизации водно-спиртовых извлечений на основе цветков каштана конского обыкновенного;
6. Результаты изучения региональной вариабельности накопления основных групп БАВ и рекомендуемых нормативов качества цветков каштана конского;
7. Результаты прогностической (*in silico*) и скрининговой доклинической (*in vitro*) оценки различных перспективных видов фармакологической активности комплекса БАВ цветков.

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 25 печатных работ, в том числе 13 статей в журналах, включенных ВАК в перечень рецензируемых научных изданий, из которых 3 статьи опубликовано в журналах, входящих в международные реферативные базы данных, получен 1 патент РФ на изобретение № 2862904.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 283 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех экспериментальных глав, выводов, библиографического указателя, включающего 275 источников, в т.ч. 82 на иностранном языке, и 11 приложений (24 стр.). Работа содержит 84 рисунка и 87 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектом исследования служили высушенные воздушно-теневым методом цветки каштана конского обыкновенного, заготовленные в Петрозаводском городском округе,

Ленинградской, Московской, Воронежской, Волгоградской областях и Ставропольском крае во время цветения в 2021-2024 году.

Макро- и микроскопический анализ осуществляли в соответствии с требованиями ГФ РФ XV. Описание внешних цветков каштана проводили с помощью стереомикроскопического анализа на микроскопе Биомед-2 (РФ). Микроскопическое исследование сырья проводили с помощью микроскопа Биомед – 6 (РФ), окуляры х 40, х100 и х400. Визуализация диагностических признаков, определение их биометрических характеристик и микрофотографии выполнялись с помощью цифровой видеокамеры «Levenhuk» C310 NG (КНР) с программным обеспечением Top View (x86).

Люминесцентный анализ осуществляли с применением люминесцентного микроскопа Микромед – 3 ЛЮМ с голубым светофильтром; источником света служила высоковольтная ртутная лампа мощностью 100 Вт, пробоподготовка не применялась.

Исследования растительных объектов методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) проводили с помощью растрового электронного микроскопа JSM-6380LV JEOL с системой микроанализа INCA 250 (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

Полный макро-, микро- и ультрамикроэлементный анализ состава изучаемого сырья в сравнении с почвой изучали методом хромато-масс-спектрометрии (ХМС) с индуктивно связанной плазмой («ELAN-DRC», США). Исследование содержания радионуклидов проводили на базе ФГБУ «Россельхозцентр» гамма-спектрометрическим методом. Исследования по определению остаточных органических пестицидов в цветках каштана конского проводили методом газовой хроматографии на хромато-масс-спектрометрическом комплексе (ГХ/МС) «Хроматэк-Кристалл 5000.2» в соответствии с указаниями ГФ РФ XV издания.

Определение фармакопейных показателей качества таких, как влажность, зола общая и нерастворимая в 10%-ной хлористоводородной кислоте, измельченность, содержание примесей проводили в соответствии с методиками, изложенными в ГФ РФ XV.

Качественный состав БАВ определяли на основании общепринятых качественных реакций. Дополнительное обнаружение некоторых групп БАВ проводили методом ТСХ. Аминокислоты (АК): система – н-бутанол: уксусная кислота: вода (4:1:2), детекция зон – 1% раствор нингидрина в спирте этиловом; моносахара: система – н-бутанол: уксусная кислота: вода (4:1:2), детекция зон – раствор, содержащий 0,86 г сульфаниламида и 0,83 г о-фталевой кислоты в 50 мл 95% этилового спирта; лейкоантоцианы (в форме собственно антоцианов): система – н-бутанол: уксусная кислота ледяная: вода (4:1:5), детекция зон – окраска зон адсорбции в видимом свете; флавоноиды: система – этилацетат: ледяная уксусная кислота: вода (5:1:1), детекция зон – 5% спиртовой раствор алюминия хлорида при просмотре в УФ-свете; сапонины: система – н-бутанол: этанол: аммиак (7:2:5), детекция зон – 25% раствор фосфорновольфрамовой кислоты в спирте этиловом с последующим нагреванием при 105ºС.

Для идентификации отдельных представителей фракции фитостеринов в цветках каштана конского использовали метод ГХ/МС (Agilent 7890B/5977A, Германия) (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

Количественное определение флавоноидов, ТС, лейкоантоцианов в сырье проводили по разработанным и валидированным методикам. УФ-спектры для изучаемых объектов были получены с помощью спектрофотометра СФ-2000 (Россия) в требуемых диапазонах длин волн в кварцевых кюветах толщиной 1 см. Количественное определение содержания суммы полисахаридов в ЛРС после осаждения спиртом этиловым 95% проводили согласно соответствующей гравиметрической фармакопейной методике ГФ РФ XIV изд. ФС.2.5.0032.15 «Подорожника большого листья». Содержание суммы свободных и связанных простых сахаров в пересчете на глюкозу в сырье определяли с применением фармакопейной СФМ методики по реакции простых сахаров с пикриновой кислотой в соответствии с ГФ РФ XIV ФС.2.5.0027.15 «Мать-и-мачехи обыкновенной листья» и ГФ РФ XV ФС.2.5.0024 «Липы цветки» и общей фармакопейной статьи (ОФС) ОФС.1.2.3.0019 «Определение сахаров спектрофотометрическим методом». Определение содержания суммы органических кислот в пересчёте на яблочную кислоту проводили по методике, изложенной в ФС.2.5.0093 ГФ РФ XV изд. «Рябины

обыкновенной плоды». Определение суммы дубильных веществ в пересчете на танин проводили в соответствии с ОФС.1.5.3.0008.18 ГФ РФ XV изд. «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Определение содержания аскорбиновой кислоты в цветках каштана конского, проводили с использованием титриметрической методики, представленной в ФС.2.5.0106.18 ГФ РФ XIV изд. «Шиповника плоды». Определение суммы свободных АК в цветках каштана конского проводили с применением дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на глутаминовую кислоту.

Определение аминокислотного состава и состава органических кислот проводили методом капиллярного электрофореза (КЭ) на базе испытательного лабораторного центра АНО «НТЦ Комбикорм» (Воронеж).

ИК-спектры сырья были получены без предварительной пробоподготовки на приборе ИК-Фурье-спектрометр VERTEX 70 (Bruker, Германия) методом НПВО и последующей обработкой программой OMNIC или GRAMS 4/32 (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

Прогноз основных видов фармакологической активности *in silico* проводили с использованием платформы PassOnline. Определение АОА водных и водно-спиртовых извлечений из цветков каштана конского проводили с помощью спектрофотометрической и титриметрической методик. Доклинические исследования биостимулирующего/биоцидного и мембранопротекторного действия настоя цветков каштана конского *in vitro* проводили в лаборатории кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ВГУ с использованием тест-системы инфузорий *Paramecium caudatum*. Исследования проводили с использованием автоматизированного аппаратно-программного комплекса «БиоЛат 3.2» производства ООО «Европолитест», Россия. Исследования антимикробной и фунгицидной активности жидкого экстракта цветков каштана в отношении пяти клинически значимых штаммов микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli,* (*Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Candida albicans*), выполнены на базе лаборатории культуромных и протеомных исследований в микробиологии НОПЦ ГЛТ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Для выбора оптимальной лекарственной формы на основе изучаемого сырья получали настой, настойки (различными технологическими приёмами) и жидкий экстракт цветков каштана конского в соответствии с требованиями к технологии, изложенными в ОФС ГФ РФ XV изд. Стандартизацию полученных образцов проводили по показателям «Описание», «Сухой остаток», «Спирт этиловый», «Плотность», «pH» «Тяжелые металлы» на основании требований действующих ОФС. Количественное определение сумм флавоноидов и сапонинов в извлечениях проводили по разработанным и валидированным методикам, также оценивали АОА и содержание суммы антиокислителей в пересчете на аскорбиновую кислоту.

Результаты исследования

1. Изучение анатомо-диагностических признаков, морфологии и других характеристик подлинности и доброкачественности цветков каштана конского

Макроскопический анализ. Сырье представляет собой отдельные цветки и их части, отделенные от общей оси соцветия. Цветки имеют неправильное строение. Чашечка зеленоватого или зеленовато-коричневого цвета, состоит из 5 сросшихся у основания чашелистиков. Венчик беловато-розового или буроватого цвета, имеет 5 лепестков, один из которых незначительных размеров или может отсутствовать. Тычиночные нити длинные, выходят за пределы венчика. Запах слабый, специфический. Описаны также внешние признаки измельченного сырья и порошка.

Стереомикроскопический анализ. В качестве основных диагностических признаков сырья, полученных при стереомикроскопическом анализе, отмечено опушение лепестков венчика и чашечки простыми многочисленными волосками различного размера, которые также встречаются на пестике и тычинках. Пыльник и кончики тычинок, как правило, без волосков, покрыты пыльцой (рис. 1).

Люминесцентный микроскопический анализ. Методом люминесцентной микроскопии установлены особенности морфологии цветков и локализации БАВ. Характерно специфическое яркое зелёно-желтое свечение тканей чашечки, венчика, трихом, жилок, тычиночных нитей и

пыльников. Также характерной красно-фиолетовой люминесценцией обладает центр лепестка венчика (рис. 2).

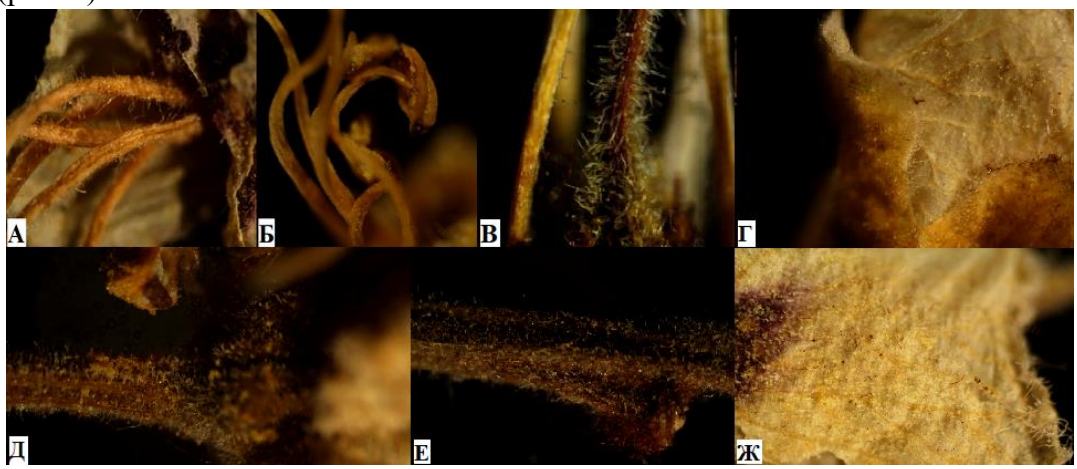


Рисунок 1 – Стереомикроскопическое исследование цветка каштана конского: А – опушение тычиночных нитей, ув.х40; Б - тычиночные нити и пыльник, ув.х40; В – опушение пестика, ув.х40; Г – структура поверхности и опушение края листка чашечки, ув.х40; Д – структура поверхности и опушение цветоножки, ув.х40; Е –бурые извилистые волоски на поверхности цветоноса, ув.х40; Ж – структура поверхности и опушение края лепестка венчика, ув.х40

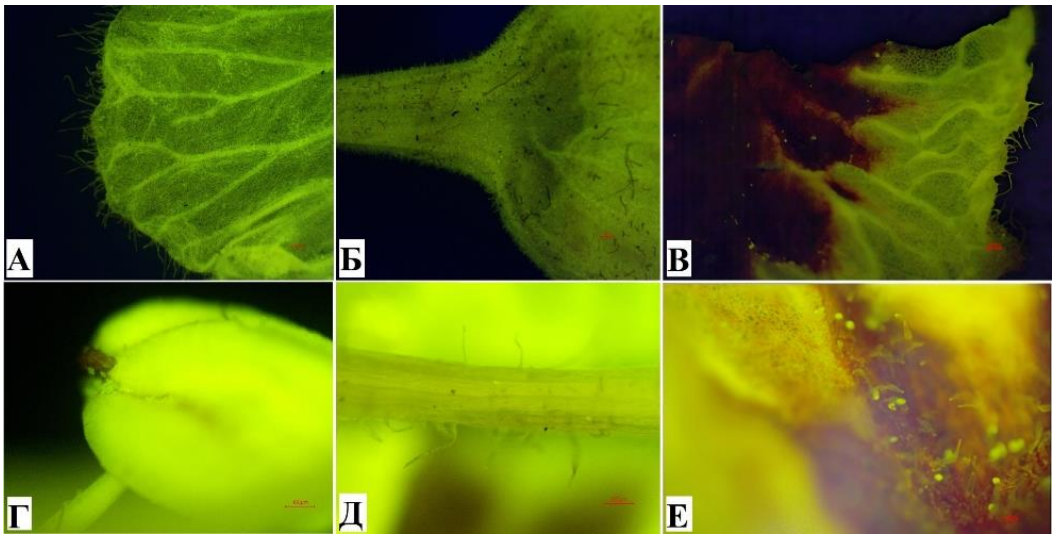


Рисунок 2 – Люминесцентная микроскопия. (х40): А – венчика (верхняя сторона); Б – чашечка и цветоножка В – венчика (нижняя сторона); (х100): Д – тычиночные нити; Г – пыльники; Е – пыльца на венчике

Световая микроскопия. К анатомо-диагностическим признакам можно отнести крупные многоугольные клетки эпидермиса с утолщенными стенками, по краю лепестка венчика и чашечки многочисленные одноклеточные и многоклеточные трихомы различного размера, часто перекрученные, с грубобородавчатой поверхностью, на поверхности лепестка венчика трихомы встречаются реже. Проводящая система венчика представлена спиральными и ленточными сосудами, чашечки – преимущественно спирального типа. На поверхности лепестка чашечки видны крупные устьица циклоцитного типа. Поверхность тычиночных нитей покрыта вытянутыми клетками эпидермиса и многочисленными одноклеточными трихомами (рис. 3).

Растровая электронная микроскопия. Метод РЭМ позволил получить объемное детализированное изображение поверхности сырья с визуализацией диагностических признаков цветков, отмеченных при проведении световой оптической микроскопии (рис. 4).

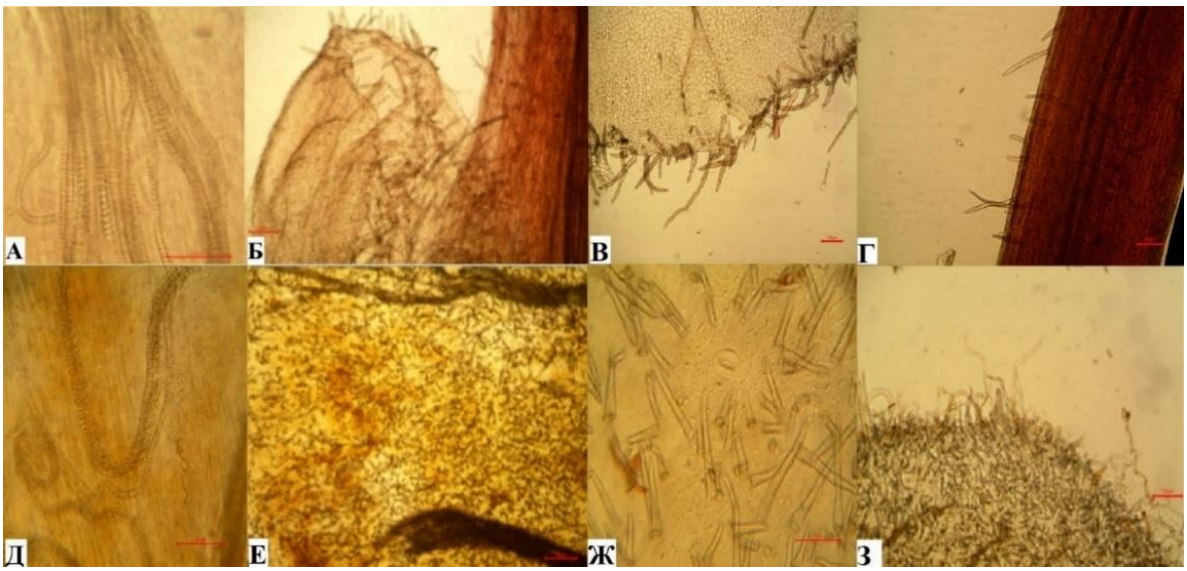


Рисунок 3 – Микроскопия цветка: А – проводящая система венчика (х400); Б – простые волоски с грубоборадавчатой поверхностью по краю лепестка венчика и его основания (х100); В – простые волоски с грубоборадавчатой поверхностью по краю лепестка венчика (х100); Г – строение тычинки (х100); Д – проводящая система чашечки (х400); Е – простые волоски на чашечке (х100); Ж – простые волоски на чашечке и устьице (х400); З – простые волоски по краю чашечки (х100)

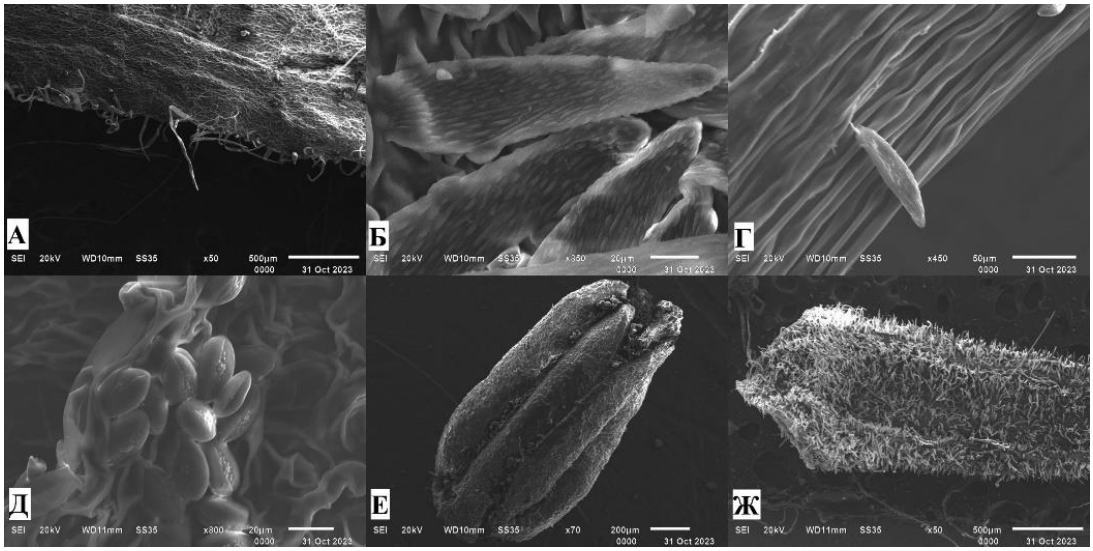


Рисунок 4 – РЭМ: Растровая электронная микроскопия: А – сгруппированные пыльцевые зерна и эпидермальные клетки (х800); Б – грубобородавчатые волоски венчика (х850); В – краевые волоски лепестка венчика (х50); Г – бороздчатость тычиночных нитей (х450); Д – полноразмерный пыльник (х70); Ж – цветоножка (х50)

Выявлены многоугольные эпидермальные клетки с утолщенными стенками и морщинистым рельефом, грубобородавчатые волоски различного размера на поверхности лепестков чашечки и венчика, с преобладанием по краям. Многочисленные пыльцевые зерна овальной формы. Поверхность тычиночных нитей бороздчатая с продольными складками. Пыльник складчатой формы, эпидермис – чешуйчатый. Следует отметить, что сырье, заготовленное на различных территориях, не имело различий.

2. Определение показателей качества цветков каштана конского

Определена региональная вариабельность фармакопейных показателей качества цветков каштана конского, таких, как влажность, зола общая и зола, нерастворимая в растворе 10%

хлористоводородной кислоты, органические и минеральные примеси (таблица 1). На основании полученных результатов рекомендованы нормативы данных показателей для включения в НД.

Содержание минеральных и органических примесей в среднем по регионам заготовки в цветках каштана конского составляло 0,25±0,02% и 0,57±0,05% соответственно. В связи с чем, были предложены следующие нормативы для включения в проект ФС: для показателя «минеральные примеси» – не более 1%, «органические примеси» – не более 1 %.

Таблица 1 – Результаты определения числовых показателей образцов сырья

№ п/п	Регион заготовки	Зола нерастворимая в 10% растворе HCl, %	Зола общая, %	Влажность, %
1	Волгоградская область	0,48±0,06	6,45±0,10	12,20±0,07
2	Ленинградская область	0,44±0,17	7,23±0,07	11,40±0,28
3	Московская область	0,27±0,08	5,66±0,03	11,70±0,07
4	Ставропольский край	0,20±0,06	6,75±0,24	10,80±0,14
5	Воронежская область	0,61±0,11	8,36±0,29	10,50±0,21
6	Петрозаводский городской округ	0,38±0,02	6,60±0,03	11,60±0,23
7	Рекомендуемое значение показателя для проекта ФС, %	Не более 2	Не более 10	Не более 14

3. Оценка безопасности применения цветков каштана конского (на примере цветков, заготовленных в Воронежской области)

В результате исследования элементного состава в сырье было установлено наличие 64 элементов. Цветки каштана содержат достаточно большое количество макроэлементов – 98,83% всего элементного состава (рис. 6).

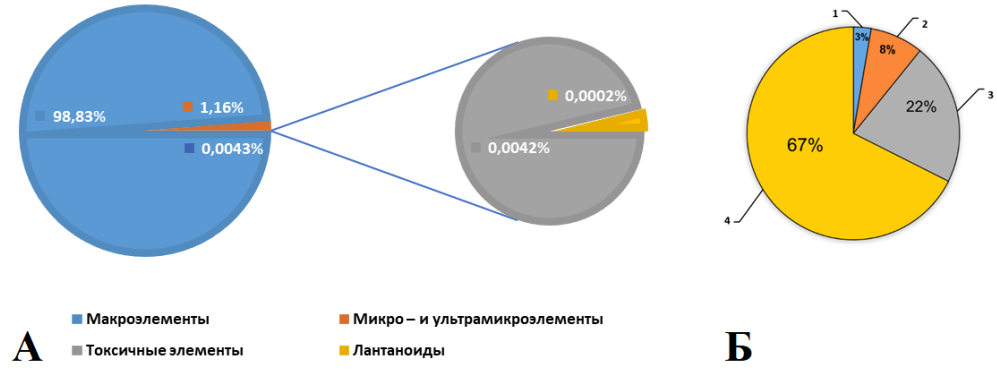


Рисунок 6 –Элементный состав цветков каштана конского: А – Соотношение групп элементов, Б – Распределение элементов в цветках каштана конского по классификации А.И. Перельмана (по Кбп): 1 – Доля элементов энергичного накопления (Р); 2 – сильного накопления (Са, К, Мо); 3 – слабого накопления и среднего захвата; 4 – слабого накопления и очень слабого захвата

Микроэлементы составляют лишь 1,16% общего минерального комплекса. Содержание нормируемых радионуклидов, остаточных пестицидов, тяжелых металлов и мышьяка в цветках каштана конского соответствует требованиям ГФ РФ XV издания (таблица 2).

4. Фитохимическое исследование цветков каштана конского

Определение экстрактивных веществ. Определено содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 40% и 70% спиртом этиловым (в эксперименте водно-спиртовые смеси в диапазоне объемного содержания спирта 40-70% давали идентичный выход) в исследуемых образцах цветков каштана конского различных регионов произрастания (таблица 3).

На основании проведенных исследований можно рекомендовать включение показателя «Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% спиртом» для сырья, используемого при

производстве настоек и экстрактов в проекте ФС «Конского каштана обыкновенного цветки» для ГФ РФ, и установить норматив не менее 25%.

Таблица 2 - Результаты изучения накопления экотоксикантов в цветках каштана конского

Испытуемый показатель	Содержание в цветках	Норматив показателя
Токсичные элементы, мкг/г		
Кадмий (Cd)	0,008	1,00
Ртуть (Hg)	0,004	0,10
Мышьяк (As)	0,08	0,50
Свинец (Pb)	1,44	6,00
Активность радионуклидов, Бк/кг		
Цезий-137	< 3	400
Стронций-90	< 1	200
Пестициды, мг/кг		
ГХЦГ (α-, β-, γ- изомеры)	0,0103	0,1
ДДТ и его метаболиты	0,0133	0,1

Таблица 3 – Содержание экстрактивных веществ в цветках каштана конского различных регионов произрастания

№ п/п	Регион заготовки	Содержание экстрактивных веществ, %	
		40% этанол	70% этанол
1	Волгоградская область	45,08±0,29	30,98±0,62
2	Ленинградская область	43,73±0,87	40,76±0,82
3	Московская область	48,96±0,03	48,95±0,98
4	Ставропольский край	38,87±1,20	34,30±0,69
5	Воронежская область	36,80±1,10	35,12±0,70
6	Петрозаводский городской округ	44,38±0,77	47,29±0,95

Разработка методик стандартизации цветков каштана конского. Разработаны и валидированы методики определения флавоноидов (в пересчете на рутин), ТС (в пересчете на β-эсцин) и лейкоантоциановых соединений в форме собственно антоцианов (в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид) в цветках. Результаты приведены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4 – Оптимальные условия выделения изучаемых групп БАВ из цветков, установленные при разработке методик

Исследуемый параметр извлечения	Содержание суммы БАВ, %		
	Флавоноиды	Сапонины	Лейкоантоцианы
Экстрагент	70% спирт этиловый		96% спирт этиловый, подкисленный HCl (С=5%)
Степень измельченности сырья (Диаметр отверстий сита), мм	1	2	1
Сырье: экстрагент	1:100		1:75
Время экстракции, мин	90		150
Кратность экстракции	2-кратная	1-кратная	1-кратная

Оценка вариабельности накопления БАВ в цветках каштана конского. С применением классических гравиметрических, титриметрических методик и современных физико-химических методов изучена изменчивость содержания БАВ цветков каштана конского в зависимости от эколого-географических условий произрастания (таблица 6).

Таблица 5 – Валидационные характеристики методик определения БАВ в цветках каштана конского

Валидационный показатель	Флавоноиды	Сапонины	Лейкоантоцианы
Линейность	y = 0,1363x+0,148 R^2 = 0,9895	y = 0,1837x+0,1161 R^2 = 0,9925	y =0,2446x+0,0081 R^2 =0,9986
Сходимость	RSD, % = 3,09 SD, % = 3,30	RSD, % = 1,28 SD, % = 1,43	RSD, % =1,15 SD, % =1,70
Правильность	R = 101,44%	$\Delta b=t_{(0,05,\ n-2)}\times S_b$ (b) = 0,1161; (S_b) = 0,0392; (Δb) = 3,18×0,0392= 0,1246 0,1161 ≤ 0,1246; b ≤ Δb	$\Delta b=t_{(0,05,\ n-2)}\times S_b$ (b) = 0,0081; (S_b) = 0,0127; (Δb) = 2,78×0,0127= 0,0353 0,0081 ≤ 0,0353; b ≤ Δb
Область линейности (БАВ в извлечении), г/мл	$0,66\text{-}3,99\times10^{-5}$	$0,24\text{-}0,72\times10^{-5}$	$0,41\text{-}2,48\times10^{-5}$
Межлабораторная прецизионность	-	-	RSD, % = 1,09 SD, % = 1,63 $F_{практ} = S_1^2 / S_2^2$ = 0,0002875 /0,000275 = 1,05 $F_{теор}$ = 3,44; $F_{практ} \leq F_{теор}$
Предел обнаружения, г/мл	$0,2\times10^{-5}$	$0,06\times10^{-5}$	$0,1\times10^{-5}$
Предел количественного определения, г/мл	$0,52\times10^{-5}$	$0,19\times10^{-5}$	$0,3\times10^{-5}$

Таблица 6 – Результаты определения содержания изучаемых групп БАВ в цветках каштана конского различных регионов произрастания

Регион произрастания	Содержание БАВ в сырье, %										
					Полисахариды						
						СППС					
	Флавоноиды	Лейкоантоцианы	Стерины	Сапонины	ОП	УП	СО глюкозы	Свободные аминокислоты	Дубильные вещества	Органические кислоты	Аскорбиновая кислота
Петрозаводский городской округ	3,41 ± 0,11	1,72 ± 0,015	12,97 ± 0,52	2,95 ± 0,04	9,78 ± 0,81	10,6 ± 0,72	8,46 ± 0,57	1,63 ± 0,07	5,38± 0,42	0,72± 0,04	0,05± 0,003
Ленинградская область	4,46 ± 0,14	1,33 ± 0,012	11,31 ± 0,45	2,08 ± 0,03	9,26 ± 0,77	8,02 ± 0,54	6,40 ± 0,43	1,18 ± 0,05	5,17± 0,40	0,57± 0,03	0,05± 0,003
Московская область	3,30 ± 0,11	1,30 ± 0,011	10,94 ± 0,44	2,20 ± 0,03	12,32 ± 1,10	12,35 ± 0,83	9,85 ± 0,66	1,94 ± 0,08	6,51± 0,51	0,56± 0,03	0,05± 0,004
Воронежская область	3,30 ± 0,11	1,51 ± 0,013	9,39 ± 0,37	1,27 ± 0,02	12,44 ± 1,11	6,78 ± 0,46	5,40 ± 0,36	3,38 ± 0,14	3,83± 0,30	0,57± 0,03	0,05± 0,004
Волгоградская область	3,53 ± 0,11	1,27 ± 0,011	11,99 ± 0,48	2,76 ± 0,04	12,95 ± 1,12	11,35 ± 0,77	9,02 ± 0,61	1,19 ± 0,05	4,26± 0,33	0,70± 0,04	0,04± 0,003
Ставропольский край	4,55 ± 0,15	1,67 ± 0,015	7,06 ± 0,28	1,80 ± 0,02	5,61 ± 0,50	10,85 ± 0,73	8,65 ± 0,58	1,07 ± 0,04	4,90± 0,38	0,65± 0,04	0,04± 0,003

УП – Удельный показатель поглощения; ОП – Осаждаемые полисахариды (гравиметрия); СО – стандартный образец; СППС – Сумма полисахаридов и простых сахаров (пикриновый метод)

В результате исследования спиртового экстракта цветков каштана конского (на примере ЛРС, заготовленного на территории Воронежской области) методом ГХ/МС был идентифицирован в составе стериновой фракции γ-ситостерол (рис. 7).

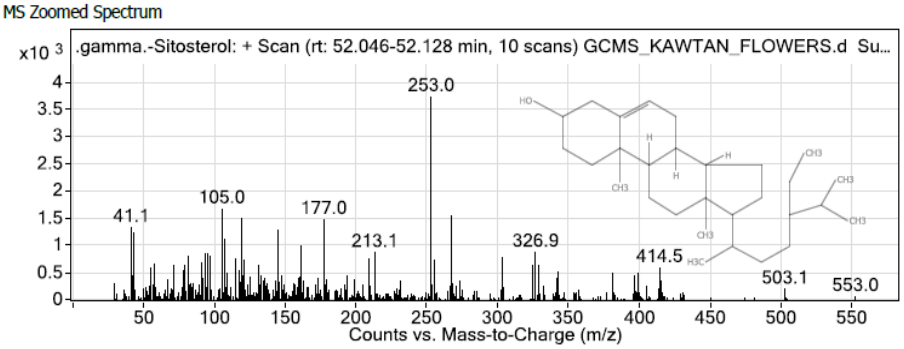


Рисунок 7 – Вид масс-спектра γ-ситостерола, выделенного из цветков каштана конского

Методом капиллярного электрофореза исследован состав свободных и связанных АК, а также профиль свободных органических кислот (таблица 7). В сырье преобладающими АК являются глутаминовая кислота, пролин, лейцин и аргинин. Суммарно, в цветках каштана конского идентифицировано от 8 до 12 кислот, в зависимости от региона произрастания. Однако для данной группы БАВ в изучаемых образцах не прослеживалось определенной тенденции накопления.

На основании проведенных исследований можно рекомендовать унифицированный критерий оценки качества данного сырья: сумма флавоноидов в пересчете на рутин (не менее 2%), сумма ТС в пересчете на β-эсцин (не менее 1%).

Изучение влияния эколого-географических факторов на химический состав сырья методом ИКС. Анализ спектров показал, что независимо от региона заготовки в ИК-спектрах наблюдаются сходные области полос поглощения по положению, что говорит о воспроизводимости вида спектра (рис. 8). Накопление фенольных соединений обусловливает наличие выраженных полос поглощения на спектрах в диапазоне от 3000 – 3300 $см^{-1}$ (валентные колебания ОН - группы в межмолекулярных водородных связях) и 1000 – 1300 $см^{-1}$ (деформационные колебания ОН - группы). На спектре группы полос различаются, в основном, своей интенсивностью, что определяется, скорее всего, неодинаковым накоплением различных групп БАВ в сырье.

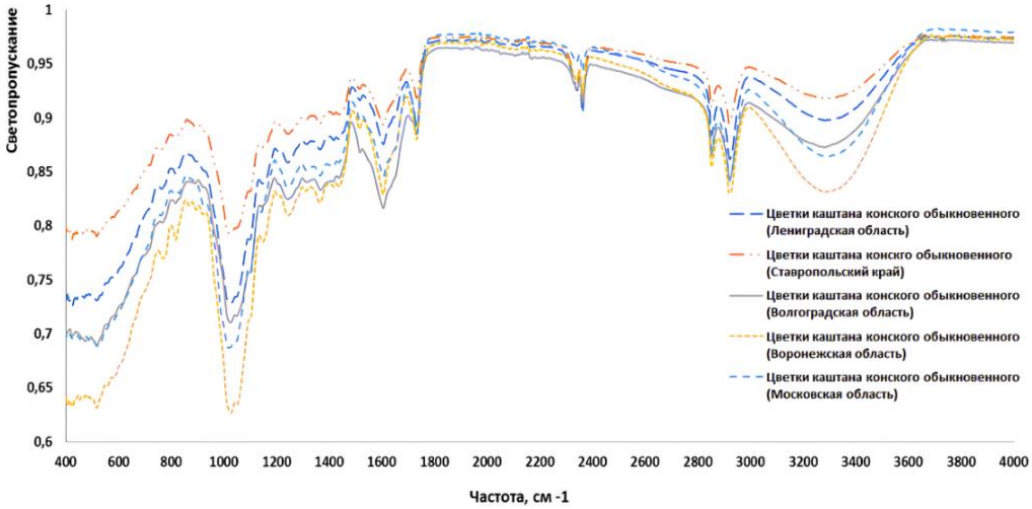


Рисунок 8 – Вид ИК-спектров изучаемых цветков, заготовленных в различных регионах произрастания на территории РФ в среднем диапазоне частот

Таблица 7 – Профиль свободных органических кислот, свободных и связанных АК цветков

№ п/п	БАВ	Ленинградская область	Московская область	Воронежская область	Волгоградская область	Ставропольский край
Содержание органических кислот в цветках, %						
1	Щавелевая	0,05	0,04	0,05	0,12	0,03
2	Муравьиная	Менее 0,15		0,17	Менее 0,15	
3	Фумаровая	0,005	0,005	0,02	0,01	0,005
4	Янтарная	0,02	0,01	0,82	0,03	0,03
5	Масляная	-	-	0,71	-	-
6	Лимонная	0,30	0,20	1,65	0,27	0,27
7	Уксусная	1,00	0,85	0,05	0,65	0,67
8	Пропионовая	2,64	2,18	0,03	2,36	2,31
9	Молочная	Менее 0,12		0,95	Менее 0,12	
10	Бензойная	0,005	0,002	0,05	7,92	0,003
11	Сорбиновая	0,01	0,01	0,05	0,02	0,02
12	Яблочная	0,007	Менее 0,05	0,15	0,06	0,01
В сумме		**4,04**	**3,30**	**4,70**	**11,44**	**3,35**
Содержание аминокислот в цветках, %						
1	Аргинин	0,51	0,54	0,72	0,68	0,57
2	Лизин*	0,19	0,26	0,35	0,30	0,25
3	Тирозин	0,11	0,15	0,23	0,21	0,15
4	Фенилаланин*	0,17	0,26	0,41	0,27	0,26
5	Гистидин	0,15	0,15	0,20	0,09	0,12
6	Лейцин*	0,44	0,63	0,58	0,79	0,65
7	Изолейцин*	0,23	0,27	0,19	0,34	0,28
8	Метионин*	0,03	0,04	0,04	0,05	0,05
9	Валин*	0,12	0,16	0,29	0,22	0,20
10	Пролин	0,36	0,63	0,63	0,65	0,68
11	Треонин*	0,32	0,36	0,41	0,35	0,30
12	Серин	0,25	0,33	0,38	0,34	0,27
13	Аланин	0,23	0,32	0,34	0,34	0,31
14	Глицин	0,24	0,29	0,38	0,34	0,30
15	Цистеин	0,04	0,05	0,07	0,05	0,04
16	Глутаминовая кислота	0,61	0,65	0,68	0,61	0,52
17	Аспарагиновая кислота	0,41	0,56	0,55	0,65	0,52
В сумме		**4,41**	**5,65**	**6,45**	**6,28**	**5,47**

* Незаменимая аминокислота

Анализ региональной изменчивости БАВ цветков каштана конского методом ТСХ. Проведено сравнительное исследование комплекса БАВ в сырье из различных регионов методом ТСХ (таблица 8). Установлено, что качественный состав БАВ не меняется в зависимости от климатических и географических особенностей произрастания производящего растения, при варьировании суммарного количественного содержания БАВ в сырье.

Оценка динамики накопления БАВ в сырье. Было выявлено, что наибольшее содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и экстрактивных веществ отмечено в фазе

бутонизации и начала цветения. В период массового цветения содержание флавоноидов несколько снижается, оставаясь значительно выше рекомендуемого минимального значения в 2%. Максимальное содержание сапонинов наблюдалось в период массового цветения (2,16±0,03%). Однако, следует отметить, что для всех фенологических фаз заготовки было характерно содержание суммы сапонинов выше рекомендуемого порогового значения в 1%. Фаза массового цветения, демонстрируя несколько сниженные, но статистически высокие показатели по содержанию экстрактивных веществ и также представляет значительный интерес для заготовки (таблица 9). Содержание БАВ в эту фазу остается на высоком уровне, что в комплексе с максимальной биомассой сырья делает сбор экономически и технологически целесообразным.

Таким образом, для заготовки цветков каштана конского можно рекомендовать два оптимальных периода: фазу бутонизации и начала цветения, как период максимальной концентрации флавоноидов и экстрактивных веществ в сочетании с умеренной концентрацией сапонинов и фазу массового цветения, как период сочетания высокой концентрации БАВ с максимальным урожаем сырья. Такой подход унифицирует процесс заготовки, обеспечивает стабильно высокое качество сырья и соответствует принципам рационального природопользования.

Таблица 8 – Интерпретация хроматографической картины разделения зон БАВ цветков каштана конского различных регионов произрастания

Показатель	Группа БАВ				
	Флавоноиды	ТС	Антоцианы	Моносахара	АК
Элюент	этилацетат: ледяная уксусная кислота: вода (5:1:1)	н-бутанол: этанол: аммиак (7:2:5)	н-бутанол: уксусная кислота ледяная: вода (4:1:5)	н-бутанол: уксусная кислота: вода (4:1:2)	
Детектирующий реагент	5% спиртовой раствор алюминия хлорида при просмотре в УФ-свете	25% раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты в 95% спирте этиловом	Собственная окраска зон адсорбции в видимом свете	1,72% сульфаниламида и 1,66% о-фталевой кислоты в 95% спирте этиловом	1% раствор нингидрина в 95% спирте этиловом
Тип извлечения	спирт этиловый 70% (подкисленный HCl до концентрации 5% для антоцианов)			водное	
Тип пластинки	«Silica gel 60 F254» ВЭТСХ, 10×15 см	«Sorbfil» ПТСХ-АФ-А, 10×10 см			
Количество зон	14, в т.ч. рутин; кверцетин; апигенин	8, в т.ч. β-эсцин	3 зоны	5, в т.ч. глюкоза	10, в т.ч. аргинин; пролин; глицин; глутаминовая кислота; валин; метионин; лейцин; фенилаланин

4. Первичная оценка видов фармакологической активности БАВ цветков и выбор оптимальных лекарственных форм на их основе

Прогноз видов фармакологической активности БАВ цветков *in silico*. Согласно данным *in silico* оценки (интернет-ресурса PASS-online) основные БАВ цветков каштана конского могут с высокой вероятностью проявлять антиоксидантную, мембранопротекторную, вазопротекторную, гепатопротекторную и противовоспалительную активности, что открывает перспективы создания ЛРП на основе данного сырья.

Таблица 9 – Сводные данные по результатам исследования состава БАВ цветков каштана конского, заготовленных на территории Воронежской области в зависимости от фенологической фазы цветения растения

№ п/п	Фенологическая фаза	Сумма флавоноидов, %	Сумма сапонинов, %	Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 70% этанолом, %
1	Бутонизация и начало цветения	3,82±0,12	1,24±0,02	33,48±0,22
2	Массовое цветение	3,51±0,11	2,16±0,03	30,20±0,90
3	Завершение цветения	2,25±0,07	1,85±0,02	22,85±1,75

Оценка АОА водных извлечений из цветков каштана конского. В результате определения АОА с применением различных методов, в пересчете на антиокислители различных групп (аскорбиновая кислота, флавоноиды и дубильные вещества), установлено, что наибольшие показатели характерны для сырья из самых северных и южных регионов (таблица 10). Полученные различия могут быть обусловлены влиянием климатических условий на биохимический состав исследуемого сырья и подтверждают перспективность его применения для дальнейшей разработки ЛРП с АОА.

Таблица 10 – АОА водных извлечений из цветков каштана конского

Регион произрастания	АОА извлечения, мг/мл			
	СФМ (в пересчете на аскорбиновую кислоту)	Перманганатометрия (в пересчете на кверцетин)	Цериметрия	
			в пересчете на аскорбиновую кислоту	в пересчете на галловую кислоту
Петрозаводский городской округ	0,0106±0,001	15,80±0,22	4,52±0,11	3,11±0,08
Ленинградская область	0,0146±0,001	12,99±0,18	4,45±0,13	3,09±0,09
Московская область	0,0085±0,001	13,00±0,18	3,70±0,11	2,57±0,08
Воронежская область	0,0113±0,001	13,07±0,19	4,05±0,12	2,82±0,09
Волгоградская область	0,0168±0,001	15,02±0,21	4,10±0,12	2,85±0,08
Ставропольский край	0,0181±0,001	12,98±0,18	4,31±0,13	2,99±0,09

Изучение биостимулирующего и/или биоцидного и мембранопротекторного действия настоя цветков каштана конского *in vitro* с использованием тест-системы инфузорий *Paramecium caudatum* в тестах «Острая токсичность» и «Функциональная нагрузка». В тесте «Острая токсичность» установлено, что настой цветков каштана конского в исследованных разведениях не оказывал биоцидного действия, а, напротив, способствовал более высокой сохранности популяции инфузорий по сравнению с контролем в течение 24-часовой

инкубации (рисунок 9). Совокупность полученных в тесте «Функциональная нагрузка» данных свидетельствуют о том, что при 24-часовой инкубации все изучаемые разведения формировали мембранопротекторный эффект разной степени выраженности. Наибольший эффект был характерен для разведения 1:10. Среднее число инфузорий за цикл превышало контроль на 35,2%, а на 3-4 минутах количество живых клеток было в 3,19–10 раз больше, чем в контрольной пробе. В разведении 1:100 после суток инкубации среднее значение числа инфузорий за цикл превышало контроль на 18,3%, в разведении 1:1000 - на 11,9%.

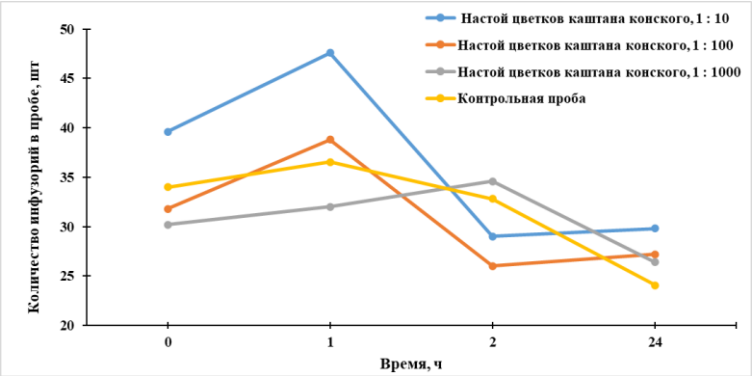


Рисунок 9 – Оценка биостимулирующего и/или биоцидного действия настоя цветков каштана конского *in vitro* в тесте «Острая токсичность»

Оценка антимикробной и фунгицидной активности жидкого экстракта на основе цветков каштана. Спиртовой экстракт цветков каштана конского не продемонстрировал антимикробной и противогрибковой активности в отношении исследуемых видов тест микроорганизмов (таблица 11). Наиболее низкая антимикробная активность экстракта каштана конского выявлена в отношении грамположительных бактерий *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus*. Для обеих культур подавление роста фиксировалось только в наиболее концентрированном разведении 1:2, тогда как 70% этанол сохранял активность против *S. aureus* и *B. cereus* до разведения 1:8. Кроме того, экстракт цветков каштана конского уступал растворителю по антимикробной активности против грамотрицательной палочки *Pseudomonas aeruginosa*. Подавление роста экстрактом наблюдалось лишь до разведения 1:8, тогда как растворитель сохранял активность в разведении 1:16. Таким образом, в отношении *S. aureus, B. cereus, P. aeruginosa* спиртовой экстракт цветков каштана конского показывал ростостимулирующее действие. Испытуемый субстрат можно рассматривать в качестве перспективного стимулятора роста и в высоких концентрациях экстракта позволяет рассматривать его как компонент новых питательных сред для наращивания бактериальной массы данных микроорганизмов.

Таблица 11 – Минимальные подавляющие разведения лабораторного образца жидкого экстракта цветков каштана (1:1) в сравнении с экстрагентом

Тест-культура	Жидкий экстракт	70% этанол
Pseudomonas aeruginosa	**1:8** (↓)	1:16
Escherichia coli	**1:8** (=)	1:8
Candida albicans	**1:16** (=)	1:16
Bacillus cereus	1:2 (↓)	1:8
Staphylococcus aureus	1:2 (↓)	1:8

* стрелками указано соотношение активности с контролем (70% этанолом), (↓) – уступает контролю; (=) – сопоставим с контролем

Выбор оптимальных лекарственных форм и их стандартизация. На основе цветков каштана получены опытные лабораторные образцы водно-спиртовых ЖЛФ (настой, настойки, экстракт жидкий). Результаты стандартизации изучаемых ЖЛФ приведены в таблице 12.

В результате проведенного исследования полученных образцов ЖЛФ на основе цветков каштана конского можно заключить, что жидкий экстракт характеризуется наиболее высоким содержанием БАВ (сухой остаток, плотность, сумма флавоноидов и сапонинов). Это может объясняться тем, что жидкий экстракт, получают при более длительном времени экстракции с дополнительным концентрированием второй части экстракта, что способствует более полному переходу БАВ из растительного сырья. Жидкий экстракт также показал сравнительно высокие показатели АОА и содержания БАВ восстановительного характера. Однако выход БАВ для других ЛФ также высок. Методом ТСХ установлено, что состав флавоноидов и сапонинов в водно-спиртовых извлечениях неоднороден. Состав флавоноидов в ЖЛФ представлен от 15 до 17 БАВ флавоноидной природы в т.ч. рутин, кверцетин и апигенин, а сапонинов – от 3 до 11 зон БАВ этой группы, включая зону β-эсцина.

Таблица 12 – Показатели качества ЖЛФ на основе цветков каштана конского

Показатель качества	Настой	Настойка (дробная мацерация)	Настойка (мацерация)	Настойка (перколяция)	Жидкий экстракт
Сумма флавоноидов, %	0,062 ± 0,002	0,105 ± 0,003	0,335 ± 0,011	0,402 ± 0,013	1,395 ± 0,045
Сумма сапонинов, %	0,07 ± 0,001	0,09 ± 0,001	0,16 ± 0,002	0,14 ± 0,002	0,46 ± 0,006
АОА×10^{-5}, г/мл (СФМ)	2,352± 0,186	11,828 ± 0,684	13,408± 3,661	10,939± 0,682	32,196± 10,244
Количество зон флавоноидов (ТСХ)	15 (для настоя) и 17 (для спиртосодержащих ЖЛФ) в т.ч. рутин, кверцетин и апигенин				
Количество зон сапонинов (ТСХ)	3 (для настоя); 11 (для настоек) и 10 (для жидкого экстракта, дополнительно разведенного 1:5 70% спиртом этиловым), т.ч. β-эсцин				
pH	6,01	-	-	-	-
Плотность, г/мл	-	0,897	0,896	0,895	0,991
Тяжёлые металлы, %	-	≤ 0,001	≤ 0,01		
Сухой остаток, %	0,135 ± 0,001	0,104 ± 0,0003	0,173 ± 0,002	0,155 ± 0,0004	0,939 ± 0,004
Содержание спирта, %	-	68,06%	66,58%	68,06%	65,08%

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. На основании проведённых морфолого-анатомических исследований цветков каштана конского обыкновенного с применением комплекса методов микроскопического анализа установлены диагностические признаки для идентификации сырья: одноклеточные волоски и многоклеточные волоски с бородавчатой поверхностью на эпидермисе лепестка венчика и листка чашечки, циклоцитный тип устьичного аппарата, сосуды со спиральным и ленточным типом утолщения, перекручивающиеся и обламывающиеся простые одноклеточные трихомы по краю лепестка венчика и листка чашечки;

2. Определены товароведческие показатели качества цветков каштана конского обыкновенного и предложены их нормативы (влажность – не более 14%; золы общей – не более

10%; золы, нерастворимой в кислоте 10% хлористоводородной – не более 2%; минеральные примеси – не более 1%; органические примеси – не более 1%);

3. Методом масс-спектрометрии установлено присутствие 58 элементов в цветках каштана конского. Результаты оценки способности цветков к накоплению токсичных элементов, остаточных пестицидов и радионуклидов показали, что изучаемое сырье может считаться экологически безопасным;

4. Разработаны и валидированы спектрофотометрические методики определения целевых групп биологически активных веществ цветков каштана конского в сырье и лекарственных формах на его основе, а также рекомендованы нормативы их содержания с учётом региональной изменчивости. Сумма флавоноидов в пересчете на рутин (не менее 2%), сумма тритерпеновых сапонинов в пересчете на β-эсцин (не менее 1%);

5. С применением современных физико-химических методов (спектрофотометрия, газовая хроматография с масс-детекцией, капиллярный электрофорез, тонкослойная хроматография, инфракрасная спектроскопия) изучена изменчивость накопления биологически активных веществ (флавоноиды, сапонины, стерины, лейкоантоцианы, полисахариды, дубильные вещества, аминокислоты, органические кислоты и др.) цветков каштана конского различных регионов произрастания;

6. Методом *in silico* дана прогностическая оценка возможных фармакологических свойств целевых групп биологически активных веществ цветков каштана конского. Подтверждена *in vitro* антиокислительная активность извлечений из цветков каштана конского. В тесте «Острая токсичность» установлено отсутствие токсического действия водных извлечений на *Paramecium caudatum,* а в тесте «Функциональная нагрузка» - выраженное биостимулирующее и мембранопротекторное действие. Выбраны перспективные направления для дальнейшей разработки лекарственных растительных препаратов (антиоксидантного, мембранопротекторного, антигиперхолистеринемического, вазопротекторного и гепатопротекторного действия);

7. Получены и стандартизированы лабораторные образцы жидких водных и водно-спиртовых лекарственных форм на основе цветков каштана конского. Среди изученных опытных лабораторных образцов водных и водно-спиртовых извлечений можно выделить жидкий экстракт (1:1) и рекомендовать его в качестве оптимальной формы. Он демонстрирует наибольшее содержание целевых групп биологически активных веществ (флавоноидов и сапонинов);

8. Научно обоснована перспективность применения цветков каштана конского обыкновенного в качестве источника биологически активных веществ. Разработаны критерии оценки качества цветков каштана конского и проект фармакопейной статьи для их стандартизации.

Практические рекомендации

Для реализации государственных задач по созданию эффективных и безопасных лекарственных препаратов отечественного производства перспективным сырьём для производства ЛРП и БАД с антиоксидантным и флеботропным действием могут служить цветки конского каштана обыкновенного благодаря их богатому химическому составу и уникальному комплексу флавоноидов и сапонинов. Результаты диссертационного исследования данного растительного сырья легли в основу проекта ФС «Конского каштана обыкновенного цветки» для ГФ РФ, который был зарегистрирован в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. Оптимальным периодом заготовки цветков

каштана конского является период массового цветения растения, в данное время достигается максимальное накопление сырьем целевых БАВ фенольной и тритерпеновой природы в совокупности с наибольшим объемом фитомассы.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Диссертационное исследование открывает путь для создания на основе цветков конского каштана новых перспективных, эффективных и безопасных фитопрепаратов, проявляющих гепатопротекторную, вазопротекторную, антиоксидантную, мембранопротекторную и антигиперхолестеринемическую активность. Следующим этапом исследования можно обозначить доклинические тесты *in vivo*. Параллельно для оценки изменчивости содержания целевых групп БАВ – флавоноидов и сапонинов в изучаемом сырье требуется проанализировать их динамику накопления в разные годы заготовки на всех изученных территориях произрастания производящего растения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Оценка подлинности каштана конского обыкновенного цветков методами микроскопического анализа / А. С. Чистякова, А. А. Сорокина, А.Д. Дунилин [и др.] // **Фармация.** – 2021. – Т. 70, № 7. – С. 32-36. **[Перечень ВАК]**

2. Влияние ультразвука на извлечение БАВ из каштана цветков / Ф.Д. Евсиков, А.Д. Дунилин, А.А. Гудкова, А.С. Чистякова // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции, Воронеж, 31 марта – 02 апреля 2022 года // Под общей редакцией А.С. Беленовой, А.А. Гудковой. – Воронеж : Воронежский государственный университет, 2022. – С. 213-219.

3. Анализ рынка лекарственных препаратов, содержащих сырье каштана конского / И.А. Занина, А.Д. Дунилин, А.С. Чистякова, Ф.Д. Евсиков // **Вопросы обеспечения качества лекарственных средств.** – 2023. – № 1 (39). – С. 37-42. **[Перечень ВАК]**

4. Дунилин, А.Д. Определение товароведческих показателей качества Каштана конского обыкновенного / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева, Ю.А. Бокарева // **Прикладные информационные аспекты медицины.** – 2023. – Т. 26, № 4. – С. 123-128. **[Перечень ВАК]**

5. Изучение экстрактивных веществ каштана конского обыкновенного цветков различных способов консервирования сырья / А.С. Чистякова, А.Д. Дунилин, А.А. Гудкова [и др.] // **Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.** – 2023. – № 3. – С. 130-136. **[Перечень ВАК]**

6. Элементный состав каштана конского (*Aesculus hippocastanum L.*) цветков, произрастающего в Воронежской области / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева, А.С. Чистякова, А.А. Гудкова // Микроэлементы в медицине. – 2023. – Т. 24, № 3. – С. 46-56.

7. Чистякова, А. С. Анализ свободных аминокислот каштана конского обыкновенного цветков / А.С. Чистякова, А.С. Болгов, А.Д. Дунилин // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции. Посвящается 25-летию создания фармацевтического факультета в Воронежском государственном университете, Воронеж, 28–29 сентября 2023 года / Под общей редакцией А. С. Беленовой, А. А. Гудковой, Н. А. Дьяковой. – Воронеж : Воронежский государственный университет, 2023. – С. 424-427.

8. Дунилин, А.Д. Оценка радионуклидного загрязнения растительных ресурсов Воронежской области на примере каштана конского цветков / А.Д. Дунилин, Ю. А. Бокарева, А.Р.

Деева // Инновационный потенциал развития общества: взгляд молодых ученых : сборник научных статей 4-й Всероссийской научной конференции перспективных разработок, Курск, 01 декабря 2023 года. – Курск : Университетская книга, 2023. – С. 24-27.

9. Изучение органических кислот и аминокислотного состава каштана конского цветков / А.С. Чистякова, А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева [и др.] // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2024. – Т. 13, № 2. – С. 125-132. **[Перечень ВАК, МБД (Scopus)]**

10. Дунилин, А.Д. Разработка и валидация методики определения флавоноидов в цветках каштана конского различных регионов произрастания / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева, Т.Ю. Ковалева // **Вестник Смоленской государственной медицинской академии**. – 2024. – Т. 23, № 3. – С. 224-234. **[Перечень ВАК]**

11. Дунилин, А.Д. Фитохимическое исследование цветков каштана конского различных регионов произрастания / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева, А.Р. Деева // **Прикладные информационные аспекты медицины.** – 2024. – Т. 27, № 1. – С. 116-122. **[Перечень ВАК]**

12. Дунилин, А.Д. Исследование состава флавоноидов цветков каштана конского различных регионов произрастания / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2024. – Т. 24, № 4. – С. 581-591.

13. Дунилин, А.Д. Определение комплекса аминокислот цветков каштана конского произрастающего в Волгоградской области / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева // XXV Международный Съезд ФИТОФАРМ 2024 : сборник тезисов, Санкт-Петербург, 07–09 октября 2024 года. – Санкт-Петербург : Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. – С. 53-54.

14. Дунилин, А.Д. Вариабельность состава амино- и органических кислот цветков каштана конского обыкновенного / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева // Биофармацевтический журнал. – 2024. – Т. 16, № 3. – С. 39-43.

15. Дунилин, А.Д. Морфолого-Анатомический анализ измельченного сырья и порошка цветков каштана конского обыкновенного различными методами / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева // **Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.** – 2024. – № 4. – С. 78-87. **[Перечень ВАК]**

16. Дунилин, А.Д. Оценка подлинности цветков каштана конского (*Aesculus hippocastanum L.*) методом растровой электронной микроскопии / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2025. – Т. 14, № 1. – С. 245-253. **[Перечень ВАК, МБД (Scopus)]**

17. Дунилин, А.Д. Исследование аминокислотного состава извлечений из цветков каштана конского различных регионов произрастания / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2025. – Т. 25, № 2. – С. 240-249.

18. Содержание фитостеринов в цветках каштана конского и перспективы разработки препаратов на их основе / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева, Е.А. Платонова, Э.М. Магеррамова // **Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.** – 2025. – № 1. – С. 131-139. **[Перечень ВАК]**

19. Исследование антиокислительной активности цветков каштана конского различных регионов произрастания методом дифференциальной спектрофотометрии / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева, А.О. Ларина, И.В. Давыдов // **Прикладные информационные аспекты медицины.** – 2025. – Т. 28, № 1. – С. 109-118. **[Перечень ВАК]**

20. Дунилин, А.Д. Особенности заготовки растительного сырья каштана конского обыкновенного цветков в условиях Ботанического сада имени профессора Б. М. Козо-Полянского

Воронежского государственного университета / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева, А.А. Воронин // Гербариум. – 2025. – Т. 2, № 4. – С. 9-16.

21. Дунилин, А.Д. ТСХ-профилирование биологически активных веществ цветков каштана конского обыкновенного / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева // Ионообменные материалы в сорбционных, хроматографических и мембранных процессах - ИОНИТЫ-2025 : материалы XVI Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 175-летию открытия явления ионного обмена и 25-летию журнала "Сорбционные и хроматографические процессы", Воронеж, 19–21 ноября 2025 года. – Воронеж : Научная книга, 2025. – С. 96-98.

22. Дунилин, А.Д. Исследование полисахаридного комплекса цветков каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum L.*) / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева // Химия растительного сырья. – 2025. – № 4. – С. 291-299.

23. Дунилин, А.Д. Исследование состава биологически активных веществ цветков каштана конского обыкновенного методом ТСХ / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2026. – Т. 26, № 1. – С. 163-175.

24. Дунилин, А.Д. Стандартизация жидких водных и водно-спиртовых извлечений из цветков каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) / А.Д. Дунилин, О.В. Тринеева // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2026. – Т. 15, № 3. – С. 180-194. **[Перечень ВАК, МБД (Scopus)]**

25. Определение сапонинов и флавоноидов в жидких водно-спиртовых лекарственных формах из цветков каштана конского методом ТСХ **/ А. Д. Дунилин**, О. В. Тринеева, А. О. Ларина, Д. А. Макеева // **Вестник Смоленской государственной медицинской академии.** – 2026. – Т. 25, № 2. – С. 201-210. **[Перечень ВАК]**

Патент

Патент № 2862904 Российская Федерация, МПК G01N 33/52 (2006.01). Способ определения антиокислительной активности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов методом обратной цериметрии : № 2025123445 : заявл. 25.08.2025 : опубл. 26.05.2026 / Тринеева О.В., Дунилин А.Д., Гудкова А.А. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет». – 21 с.

Список использованных сокращений

АК – аминокислоты
АОА – антиокислительная активность
БАВ – биологически активные вещества
ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации
ГХ/МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором
ЖЛФ – жидкие лекарственные формы
ИКС – инфракрасная спектроскопия
КЭ – капиллярный электрофорез
ЛП – лекарственный препарат
ЛРП – лекарственный растительный препарат
ЛРС – лекарственное растительное сырье
ЛФ – лекарственная форма
НД – нормативная документация
ФС – фармакопейная статья
ОФС – общая фармакопейная статья
РФ – Российская Федерация
РЭМ – растровая электронная микроскопия
СФМ – спектрофотометрия
ТС – тритерпеновые сапонины
ТСХ – тонкослойная хроматография