



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



СОСТАВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ КАШТАНА КОНСКОГО (*AECULUS HIPPOCASTANUM* L.)

Курченко В.П.*¹, Сушинская Н.В.¹,
Майорова К.И.¹, Тарун Е.И.², Бондарук А.М.³,
Цыганков В.Г.³, Фатыхова С.А.⁴, Шабуня П.С.⁴

¹ Белорусский государственный университет,

² Международный государственный экологический институт
имени А.Д.Сахарова,

³ Центр гигиены и эпидемиологии Министерства
здравоохранения РБ,

⁴ Институт биоорганической химии НАН Беларуси;
Минск (Республика Беларусь)

*E-mail: kurchenko@tut.by

Проведено исследование состава биологически активных веществ, спиртовых экстрактов из цветов *Aeculus hippocastanum* L. По результатам ВЭЖХ-МС и ГХ-МС анализов экстракт содержит значительные количества фенольных соединений: кверцетина, эпикатехина, кемпферола. Кроме этого в составе экстракта содержатся жирные кислоты и их эфиры, спирты, 3-дезоксид-манно лактон, 1,2,3,5-циклогексантетрол, α-метил-маннофуранозид, γ-ситостерол. Антиоксидантная активность экстракта из цветов *A. hippocastanum* связана с особенностями состава БАВ. Токсиколого-гигиеническая оценка экстракта цветов этого вида в остром и подостром экспериментах показала, что он относится к 4 классу опасности (является малоопасным).

Ключевые слова: каштан конский ♦ терпеноиды, флавоноиды ♦ фенилпропаноиды ♦ стероиды ♦ антиоксидантная активность

COMPOSITION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF THE HORSE CHESTNUT (*AECULUS HIPPOCASTANUM* L.)

Kurchenko V.P.*¹, Sushinskaya N.V.¹,
Maiorava K.I.¹, Tarun E.I.², Bondaruk A.M.³,
Tsygankov V.G.³, Fatykhava S.A.⁴, Shabunya P.S.⁴

¹ Belarusian State University,

² International State Ecological Institute
named after A.D. Sakharov,

³ Scientific and Practical Center for Hygiene.

⁴ Institute of Bioorganic Chemistry
of the National Academy of Sciences of Belarus;
Minsk (Republic of Belarus)

*E-mail: kurchenko@tut.by

The study of the composition of biologically active substances, alcoholic extracts from flowers of *Aeculus hippocastanum* L. According to the results of HPLC-MS and GC-MS analyzes, the extract contains the main amounts of phenolic compounds: quercetin, epicatechin, kaempferol. In addition, the extract contains fatty acids and their esters, alcohols, 3-deoxy-d-manno lactone, 1,2,3,5-cyclohexantethrol, α-methyl-mannofuranoside, γ sitosterol. Antioxidant activity of an extract from flowers of *A. hippocastanum* is associated with the peculiarities of the composition of biologically active substances. The toxicological-hygienic assessment of flowers of this species in acute and subacute experiments showed that it belongs to the 4th hazard class (low hazard).

Keywords: horse chestnut ♦ terpenoids ♦ flavonoids ♦ phenylpropanoids ♦ steroids ♦ antioxidant activity

Поступила в редакцию: 16.03.2021

DOI: [10.31163/2618-964X-2021-4-1-33-39](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2021-4-1-33-39)

ВВЕДЕНИЕ

Биологически активные вещества (БАВ) определяют фармакологические свойства лекарственных растений, что позволяет использовать их в качестве сырьевого источника для фармакологической промышленности. Однако, большая часть растений не введена в статус лекарственных. Актуальной задачей является расширение спектра растений, используемых в качестве источника лекарственного растительного сырья. Для разработки новых лекарственных препаратов перспективными таксономическими группами являются представители родов *Forsythia*, *Syringa*, *Osmanthus*, *Aesculus* [Мазнев, 2012]. Среди видов рода *Aesculus* важным источником получения биологически активных веществ могут

служить цветы каштана конского (*A. hippocastanum* L.). Этот род насчитывает 13 видов деревьев и кустарников, произрастающих в умеренных лиственных лесах. Родиной конского каштана обыкновенного является юг Балканского полуострова [Мазнев, 2012]. В Центральном ботаническом саду НАН Беларуси интродуцировано большинство видов этого рода.

В проведенных ранее исследованиях отмечено присутствие в экстрактах из плодов, листьев и коры каштана конского разнообразных групп соединений, относящихся к производным гидроксикоричных кислот [Мазнев, 2012], кумаринам [Мазнев, 2012; Zang et al., 1997]; тритерпеновым соединениям [Мазнев, 2012]; пуриновым производным [Мазнев, 2012]; производным кемпферола и кверцетина [Мазнев, 2012; Dudek-Makuch et al., 2011; Kurpusamy, Das, 1991; Kurpusamy et al., 1990]. Показана возможность использования настоя цветков конского каштана в качестве успокаивающего, снижающего артериальное давление средства. Эксперименты на лабораторных животных показали эффективность использования жидкого экстракта из листьев и цветков *A. hippocastanum* в качестве противовоспалительного средства [Беленький, 1963].

В связи с этим, представлялось целесообразным провести углубленное исследование состава БАВ этанольного экстракта цветов *A. hippocastanum* с использованием хромато-масс-спектрометрических методов анализа, определить его антиоксидантные свойства и дать токсиколого-гигиеническую оценку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили цветы каштана конского (*Aeculus hippocastanum*), высушенные до постоянной массы при комнатной температуре.

Получение экстрактов из цветов каштана конского. Экстракцию веществ из заготовленных измельченных цветов *A. hippocastanum* проводили 70 %-ным раствором этанола. В пробирки с притертой крышкой вносили навеску воздушно-сухого сырья и добавляли экстрагент в соотношении 1:10. Экстракцию проводили в термостате Precitherm PFV при температуре 35 °С в течение 1 часа. Полученные экстракты фильтровали через бумажный фильтр. Содержание сухих веществ в этанольном экстракте составляло 0,19 г/мл

Хромато-масс-спектрометрический анализ экстрактов.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ-МС) экстрактов цветов *A. hippocastanum* была проведена с использованием хроматографа Agilent 1200 с масс-селективным Agilent 6410 TripleQuad и диодно-матричным Agilent G1315C детекторами. Разделение компонентов проб проводили на колонке Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 100 мм; 3,5 мкм) при температуре +35 °С. Объем инъекции составлял 2 мкл. Подвижная фаза: А – 0,1 %- ный раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде, В – 100 % метанол. Был использован градиентный режим элюирования с изменением процента подвижной фазы В – от 5 % до 80 % за 15 мин при скорости течения элюента – 0,5 мл/мин. Длина волны 270 нм. Интерфейс ионизации - электроспрей в режиме генерации положительных и отрицательных ионов. Для проведения анализа использовали режимы полного сканирования (MS2-Scan) в диапазоне масс от 100 до 1500 Да. Параметры работы детектора: температура осушающего газа – +300 °С; скорость потока осушающего газа – 8 л/мин; давление на распылителе – 30 psi; напряжение на капилляре – 4000 вольт; напряжение на фрагменторе – 135 вольт. Качественный анализ хроматограмм общего ионного тока, масс-спектров и хроматограмм

с диодно-матричного детектора проводили с использованием компьютерного обеспечения Agilent MassHunter Workstation Software version B.01.03 (Agilent Technologies Inc., USA).

ГХ-МС анализ экстрактов цветов *A. hippocastanum* был проведен на газовом хроматографе Agilent 6850 с масс-селективным детектором Agilent 5975B. Для анализа использовалась капиллярная колонка DB-5MS (5 % Phenyl Methyl Siloxane, J&W 122-5062) длиной 60 метров, внутренним диаметром 0,25 мм. Температура инжектора – 300 °С, температура интерфейса – 300 °С. Газ-носитель – гелий, объемная скорость газа-носителя – 1 мл/мин. Температурная программа: начальная температура термостата – 35 °С, подъем температуры со скоростью 5 °С/мин до 170 °С (изотермический режим в течение 7 минут); подъем температуры со скоростью 7 °С/мин до 280°С (изотермический режим в течение 10 минут). Время анализа 59,71 минут. Объем пробы 1 мкл, ввод пробы со сбросом 70:1. Параметры масс-детектора: температура источника – 230 °С, температура квадруполя – 150 °С. Идентификацию компонентов по масс-спектрам осуществляли с использованием библиотеки масс-спектров NIST0.5a. Относительно массы экстрактивных веществ определялось % содержание индивидуальных соединений [Курченко и др., 2019].

Антирадикальную активность БАВ экстрактов цветов проводили по ранее описанной методике [Halavach et al., 2016]. Токсиколого-гигиеническую оценку (острый, подострый эксперимент) экстрактов БАВ проводили на тест-объекте *Tetrahymena pyriformis* [Halavach et al., 2016]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием общепринятых методов вариационной статистики пакета «Анализ данных» программы «Microsoft Office Excel 2003» (Microsoft Corporation).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экстракт цветов каштана был проанализирован методом жидкостной хроматографии с масс-селективным и диодно-матричным детекторами. Полученные хроматограммы представлены на рисунке 1. Для веществ, присутствующих на хроматограмме, зарегистрированной при 270 нм (максимум поглощения флавоноидов и фенольных соединений), были проанализированы масс-спектры при положительной и отрицательной

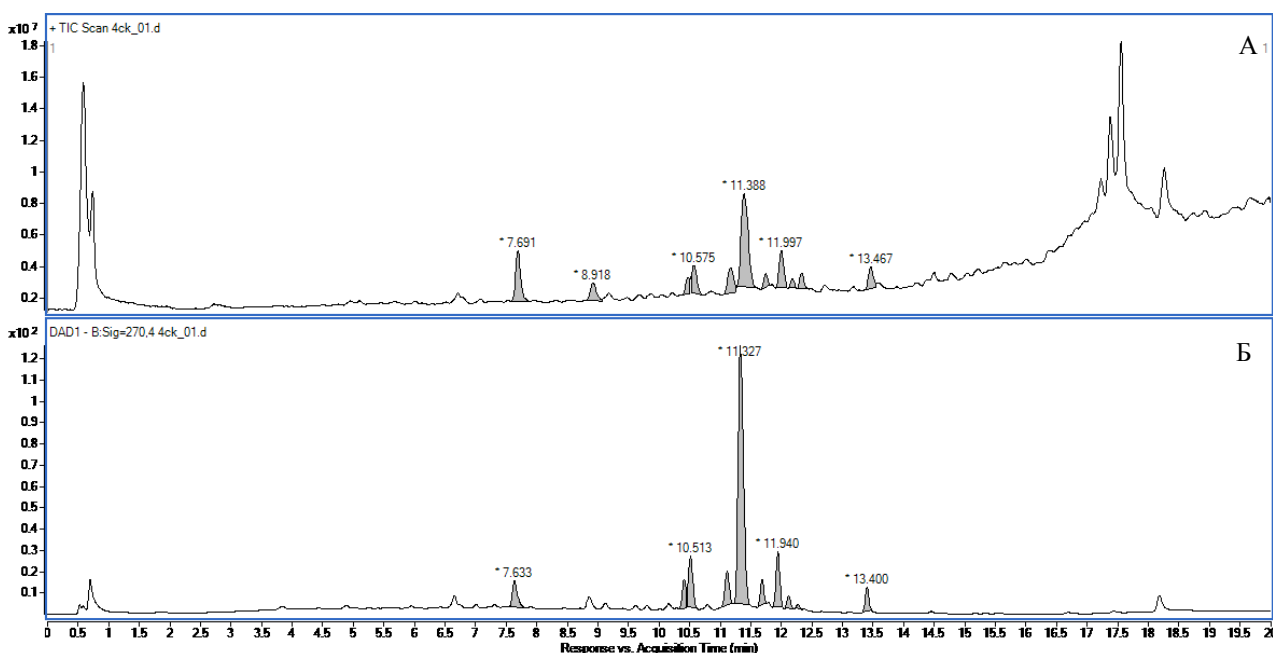


Рисунок 1 – ВЭЖХ хроматограммы спиртового экстракта цветов *A. hippocastanum* с масс-селективного (А) и диодно-матричного (Б) детекторов.

ионизациях. В экстракте цветов каштана удалось обнаружить 11 веществ, из которых 8 были идентифицированы при сравнении с масс-спектрами, представленными в [Oszmiański et al., 2014; Dudek-Makuch, Matlawska, 2011; Kapusta et al., 2007; Dudek-Makuch, Matlawska, 2013] (Таблица 1). Основными компонентами экстракта являются флаван-3-ол эпикатехин, флавонолы (кверцетин, кемпферол) и их гликозиды. Гликозилирование флавонолов подтверждается появлением в масс-спектрах фрагментов, соответствующих потере рамнозы (-146), гексозы (-162) и пентозы (-132), а также наличием ионов с m/z 287⁺ и 303⁺ (протонированные остатки агликонов – кемпферола и кверцетина).

Таблица 1 – Состав БАВ спиртовых экстрактов цветов *A. hippocastanum* L., полученный с использованием ВЭЖХ-МС

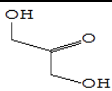
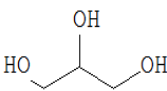
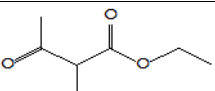
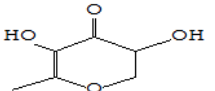
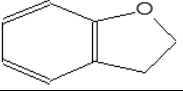
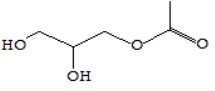
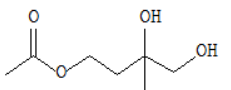
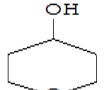
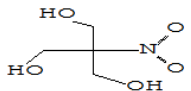
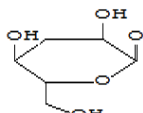
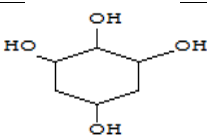
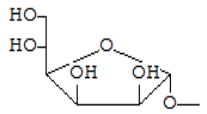


| Название вещества | Время удерживания, мин | Молекулярная масса, Да | Молекулярный ион, m/z | | Характерные ионы в масс-спектре, m/z | |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------------------------|---|
| | | | [M-H] ⁻ | [M+H] ⁺ | ESI ⁻ | ESI ⁺ |
| Эпикатехин | 7,7 | 290 | 289 | 291 | 579 [2M-H] ⁻ | 603[2M+H] ⁺ |
| Кемпферол-пентозил-гексозид | 10,5 | 580 | 579 | 581 | - | 603 [M+Na] ⁺ 449 [M-132] ⁺ 287 [M-132-162] ⁺ |
| Кверцетин-гексозил-рамнозид | 10,6 | 610 | 609 | 611 | 463[M-146] ⁻ | 465[M-146] ⁺ 303 [M-146-162] ⁺ |
| Кемпферол-гексозил-рамнозид | 11,4 | 594 | 593 | 595 | 447[M-146] ⁻ | 449[M-146] ⁺ 287 [M-146-162] ⁺ |
| Ацилированный гликозид кемпферола | 11,8 | 534 | 533 | 535 | - | 287 [M-248] ⁺ |
| Кемпферол-пентозид | 11,9 | 418 | 417 | 419 | 835 [2M-H] ⁻ | 287 [M-132] ⁺ 441 [M+Na] ⁺ 859[2M+Na] ⁺ |
| Кемпферол-рамнозид | 12,2 | 432 | 431 | 433 | - | 287[M-146] ⁺ 455[M+Na] ⁺ 887[2M+Na] ⁺ |
| Кемпферол | 13,4 | 286 | 285 | 287 | - | - |

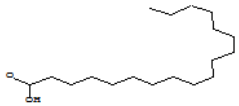

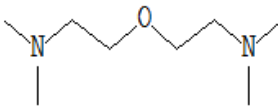

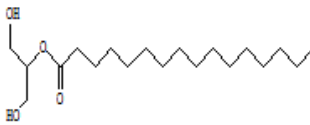

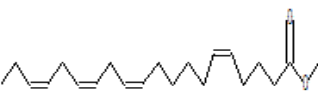
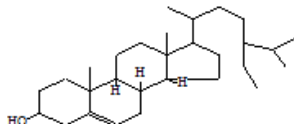
Методом ГХ-МС дополнительно было идентифицировано более 35 химических соединений, часть из которых представлена в таблице 2. Следует отметить, что проанализированный экстракт цветов каштана содержит значительные количества дигидроацетона, глицерина, жирных кислот и их эфиров, а также различные спирты, 3-дезоксид-манно лактон, 1,2,3,5-циклогексантиол, α-метил-маннофуранозид. Еще одним важным компонентом экстракта является γ-ситостерол.

Проведенные хроматографические исследования состава экстрактов цветов *A. hippocastanum* показали наличие в нем большого количества соединений, которые могут проявлять антиоксидантную активность (АОА). С помощью набора реагентов «ФитХем» определена АОА экстракта цветов *A. hippocastanum*. Согласно полученным данным построены графики зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации экстракта цветов каштана. В соответствии с полученными уравнениями, рассчитана процентная концентрация, при которой достигается 50% ингибирования свободных радикалов – IC₅₀. Для экстракта цветов каштана конского эта величина составила 5,3 * 10⁻⁵ % разведения исходного экстракта, что характеризует его высокую антиоксидантную

активность в том числе и при сравнении с экстрактами из других лекарственных растений [Курченко и др., 2019]. Это может быть связано с высоким содержанием флавоноидов и других вторичных метаболитов.

Таблица 2 – Структура и относительное содержание основных биологически активных веществ в экстрактах цветов каштана

| Наименование вещества | Формула | Относительное содержание (%) в экстрактах каштана |
|--|---|---|
| Дигидроацетон |  | 16 |
| Глицерин |  | 4,34 |
| 2-метил-3-оксо-этиловый эфир бугановой кислоты |  | 1,12 |
| 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-ОН |  | 1,35 |
| 2,3-дигидро-бензофуран |  | 0,6 |
| 1-ацетат-1,2,3-пропантриол |  | 2,25 |
| 3,4-дигидрокси-3-метилбутиловый эфир уксусной кислоты |  | 1,18 |
| Тетрагидро-4Н-пиран-4-ол |  | 0,51 |
| 2-(гидроксиметил)-2-нитро-1,3-пропандиол |  | 2,2 |
| 3-дезоксид-манно лактон |  | 6,76 |
| 1-α,2-β,3-α,5-β-Циклогексантетрол |  | 12,67 |
| α-метил-маннофуранозид |  | 31,6 |
| n-гексадекановая кислота |  | 1,94 |
| метильный эфир (Z, Z, Z)-9,12,15-октадекатриеновой кислоты |  | 1,07 |

| | | |
|--|---|------|
| (Z, Z, Z)-9,12,15-октадекатриеновая кислота |  | 3,37 |
| Генейкозан |  | 1,55 |
| Бис(2-(Диметиламино)этил)эфир |  | 0,57 |
| Гексатриконтан |  | 1,2 |
| 2-гидрокси-1-(гидроксиметил)этиловый эфир гексадекановой кислоты |  | 1,46 |
| Генейкозан |  | 2,01 |
| Метил (Z)-5,11,14,17-эйкосатетраеноат |  | 1,76 |
| γ-ситостерол |  | 1,63 |

Первичная токсиколого-гигиеническая оценка спиртового экстракта в остром и подостром экспериментах с использованием тест-объекта *Tetrahymena pyriformis* показала, что острая токсичность для ЛД₅₀ составляла не более 26,9±0,6 мг/мл, а в подострой токсичности ЛД₅₀ была не выше 23,6±0,1 мг/мл. По среднесмертельной дозе и коэффициенту кумуляции спиртовой экстракт *A. hippocastanum* относится к 4 классу опасности (является малоопасным).

Проведенное фитохимическое исследование с использованием методов ВЭЖХ-МС и ГХ-МС позволило идентифицировать в составе спиртового экстракта цветов *A. hippocastanum* значительные количества БАВ: эпикатехина, кемпферола, кверцетина и их гликозилированных производных, жирных кислот и их эфиров, спиртов, γ-ситостерола и др. Экстракт проявлял высокую антиоксидантную активность и оказался малотоксичным (4 класс опасности по токсиколого-гигиенической оценке). Таким образом, цветы *A. hippocastanum* могут служить перспективным фармакологическим сырьем для получения БАВ с разнообразной биологической активностью. Содержащиеся в экстракте производные кемпферола и кверцетина известны своим благоприятным воздействием на сосудистую систему. Показано, что они способны ингибировать гиалуронидазу через хелатирование ионов меди в молекулах ферментов [Kuppusamy, Das, 1991; Kuppusamy et al., 1990]. Также флавоноиды защищают капиллярную стенку, нормализуют проницаемость сосудов и увеличивают защитный эффект эндотелия посредством стабилизации мембранных фосфолипидов [Di Carlo et al., 1999; Harborne, Williams, 2000]. Другие компоненты экстракта цветов *A. hippocastanum* способны оказывать неспецифические спазмолитические эффекты и

снижать артериальное давление, а в комплексе с флавоноидами регулировать тонус кровеносных сосудов [Harborne, Williams, 2000; Ojewole, Adesina, 1983]. В то же время для регистрации *A. hippocastanum* в качестве лекарственного растения требуется проведение дополнительных фармакологических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мазнев Н.И. Высокоэффективные лекарственные растения. Большая энциклопедия. – М.: Эксмо, 2012. – 656 с.
2. Zang Z., Hu Z., Yang G. Identification and determination of aesculin and aesculetin in ash barks by capillary zone electrophoresis // *Chromatographia*. 1997. V. 44 (3/4). P. 162–168. DOI: [10.1007/BF02466450](https://doi.org/10.1007/BF02466450)
3. Dudek-Makuch M., Matlawska I. Flavonoids from the flowers of *Aesculus hippocastanum* L. // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 2011. Vol. 68 No. 3. P. 403–408.
4. Kuppusamy U.R., Das N.P. Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases // *Experientia*. 1991. V. 47 (11-12). P. 1196–1200. DOI: [10.1007/BF01918384](https://doi.org/10.1007/BF01918384)
5. Kuppusamy U.R., Khoo H.E., Das N.P. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase // *Biochemical Pharmacology*. 1990. V. 40, (2). P. 397–401. DOI: [10.1016/0006-2952\(90\)90709-T](https://doi.org/10.1016/0006-2952(90)90709-T)
6. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – М: Наука, 1963. – 150 с.
7. Курченко В.П., Сушинская Н.В., Чубарова А.С., Тарун Е.И., Куприянов А.Н., Хрусталева И.А., Бондарук А.М., Цыганков В.Г., Журихина Л.Н., Филонюк В.А., Шабуня П.С. Состав биологически активных веществ экстрактов цветов тысячелистников аборигенной флоры Беларуси и Казахстана, их антиоксидантные свойства и токсичность // *Экобиотех*, 2019, № 3. С. 286–292. DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-3-286-292](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-286-292)
8. Golovach T.N., Dudchik N.V., Veremeenko E.G., Tsygankov V.G., Bondaruk A.M., Filanyuk V.A., Shevlyakov V.V., Ushkov A.A., Sobol' Yu.A., Erm G.I., Kurchenko V.P. Evaluation of antimutagenic and antifungal properties, parameters of acute toxicity and sensitizing activity of enzymatic whey protein hydrolysate // *Foods and Raw Materials*. 2016. V. 4, № 2. P. 105–114. DOI: [10.21179/2308-4057-2016-2-38-47](https://doi.org/10.21179/2308-4057-2016-2-38-47)
9. Oszmiański J., Kalisz S., Wojdyło A. The content of phenolic compounds in leaf tissues of White (*Aesculus hippocastanum* L.) and Red Horse chestnut (*Aesculus carea* H.) colonized by the horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deschka & Dimić) // *Molecules*. 2014. V. 19. P. 14625 – 14636. DOI: [10.3390/molecules190914625](https://doi.org/10.3390/molecules190914625)
10. Dudek-Makuch M., Matlawska I. Flavonoids from the flowers of *Aesculus Hippocastanum* // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 2011. V. 68, № 3. P. 403–408.
11. Kapusta I. Janda B., Szajwaj B., Stochmal A., Sonia P., Pizza C., Franceschi F., Franz C., Oleszek W. Flavonoids in Horse Chestnut (*Aesculus hippocastanum*) seeds and powdered waste water by products // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007. V. 55 (21). P. 8485–8490. DOI: [10.1021/jf071709t](https://doi.org/10.1021/jf071709t)
12. Dudek-Makuch M., Matlawska I. Coumarins in Horse Chestnut flowers // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 2013. V. 70, № 3. P. 517–522.
13. Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs // *Life Sciences*. 1999. V. 65 (4). P. 337–353. DOI: [10.1016/S0024-3205\(99\)00120-4](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00120-4)
14. Harborne J.B., Williams C.A. Advances in flavonoid research since 1992 // *Phytochemistry*. 2000. V. 55 (6). P. 481–504. DOI: [10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)
15. Ojewole, J.A., Adesina S.K. Mechanism of the hypotensive effect of scopoletin isolated from the fruit of *Tetrapleura tetraptera* // *Planta Medica*. 1983. V. 49 (9). P. 46–50. DOI: [10.1055/s-2007-969809](https://doi.org/10.1055/s-2007-969809)