

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СВЕЖИХ ПЛОДОВ БОЯРЫШНИКА ПОЛУМЯГКОГО

В.А. Куркин

д.фарм.н., зав. кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, Самарский государственный медицинский университет
E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

И.Х. Шайхутдинов

аспирант,
кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, Самарский государственный медицинский университет

О.Е. Правдивцева

д.фарм.н., доцент,
кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, Самарский государственный медицинский университет

Е.В. Авдеева

д.фарм.н., профессор,
кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, Самарский государственный медицинский университет

А.В. Куркина

д.фарм.н., доцент,
кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, Самарский государственный медицинский университет

В.В. Стеняева

к.фарм.н., доцент,
кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, Самарский государственный медицинский университет

Н.Р. Варина

к.фарм.н., доцент,
кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, Самарский государственный медицинский университет

А.В. Жданова

к.фарм.н., доцент,
кафедра общей, бионеорганической и биоорганической химии, Самарский государственный медицинский университет

Актуальность. Плоды боярышника полумягкого (мягковатого) (*Crataegus submollis* Sarg., сем. Розоцветные – Rosaceae) являются популярным пищевым продуктом, однако в медицинской практике в настоящее время не используются. Ранее была показана возможность применения свежих плодов боярышника полумягкого в качестве источника антидепрессантных и диуретических лекарственных препаратов. Одним из новых лекарственных препаратов может являться сок на основе свежих плодов боярышника полумягкого. В свежих плодах боярышника полумягкого преобладают восстановленные формы флавоноидов – процианидины. Проведенный ранее анализ сока из свежих плодов боярышника полумягкого с использованием спектрофотометрии показал, что максимум поглощения в УФ-спектре составляет 282 нм, что совпадает с максимумом поглощения раствора катехина, являющегося биогенетическим предшественником процианидинов.

Цель исследования – разработка методики количественного определения суммы процианидинов в свежих плодах боярышника полумягкого.

Материал и методы. Объектом исследования служили свежие плоды боярышника полумягкого, заготовленные в сентябре 2019 г. на территории г. Самары и Самарской области. Методом анализа являлась прямая спектрофотометрия при длине волны 282 нм в пересчете на катехин.

Результаты. Разработана методика количественного определения суммы процианидинов (в пересчете на катехин) в свежих плодах боярышника полумягкого методом прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 282 нм. Определено, что содержание суммы процианидинов варьирует в свежих плодах боярышника полумягкого от $0,52 \pm 0,03\%$ до $0,97 \pm 0,06\%$ (в пересчете на катехин). Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 5,81\%$. Наиболее высокое содержание процианидинов можно отметить в чашелистиках и кожце свежих плодов боярышника полумягкого.

Выводы. Свежие плоды боярышника полумягкого являются перспективным лекарственным растительным сырьем. В результате проведенного исследования разработана методика количественного определения суммы процианидинов в свежих плодах боярышника полумягкого (мягковатого) (*Crataegus submollis* Sarg.) методом прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 282 нм в пересчете на катехин.

Ключевые слова: боярышник полумягкий (мягковатый), *Crataegus submollis* Sarg., плоды, флавоноиды, процианидины, катехин, спектрофотометрия.

Для цитирования: Куркин В.А., Шайхутдинов И.Х., Правдивцева О.Е., Авдеева Е.В., Куркина А.В., Стеняева В.В., Варина Н.Р., Жданова А.В. Разработка подходов к стандартизации свежих плодов боярышника полумягкого. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020; 23(3): 37–42. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-03-07>

Боярышник полумягкий (мягковатый) (*Crataegus submollis* Sarg., сем. Розоцветные – Rosaceae) в диком виде произрастает на территории Северной Америки. При этом данное растение давно культивируется в РФ и применяется в пищевых и декоративных целях [1]. Как показали исследования, проведенные ранее, плоды боярышника полумягкого имеют сходство химического состава с плодами боярышника кроваво-красного по содержанию витаминов и флавоноидов [2–5]. Отличительной особенностью является тот факт, что плоды боярышника полумягкого имеют более крупные размеры по сравнению с фармакопейными видами, поэтому сушка данного сырья затруднительна.

Одним из эффективных способов переработки сырья является получение сока свежих плодов на первой стадии технологического процесса [6]. Шрот, оставшийся после отжима сока, высушивается гораздо быстрее и может быть использован в дальнейшем для получения экстракционных препаратов [5, 6]. Как показали исследования, проведенные на белых беспородных крысах, сок свежих плодов боярышника полумягкого в зависимости от дозы может оказывать диуретическое действие [6]. Поэтому сок может рассматриваться в качестве перспективного лекарственного растительного препарата. Необходимым условием для внедрения свежих плодов боярышника полумягкого в качестве нового вида лекарственного растительного сырья является разработка подходов к их стандартизации.

В научной литературе описаны разнообразные методические и методологические подходы к количественному определению суммы флавоноидов в плодах боярышника, причем в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания стандартизация данного сырья осуществляется по гиперозиду [4]. Ранее была предложена методика количественного определения восстановленной формы флавоноидов – процианидинов, а также суммы антоцианов в пересчете на цианидина хлорид – флавоноид, биогенетически близкий к катехину [2, 7]. В этом случае используется пробоподготовка – кислотный гидролиз, приводящий к расщеплению процианидина на катехин и цианидина хлорид. Следовательно, в данной методике используется подход, предусматривающий определение восстановленных форм флавоноидов. На наш взгляд, данная методика многостадийна и, кроме того, может давать заниженные результаты, так как в результате кислотного гидролиза процианидина образуются цианидина хлорид и катехин

[7], тогда как в качестве аналитической длины волны используется значение 550 нм (максимум поглощения цианидина хлорида). Именно данный подход используется в Европейской фармакопее, в соответствии с которой в плодах боярышника определяется содержание процианидинов [8].

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – разработка методики количественного определения суммы процианидинов в свежих плодах боярышника полумягкого.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили свежие плоды боярышника полумягкого, заготовленные в сентябре 2019 г. на территории Ботанического сада Самарского университета, а также за чертой города на территории Самарской области.

Проведенный ранее анализ сока из свежих плодов боярышника полумягкого с использованием УФ-спектрофотометрии показал, что максимум поглощения в УФ-спектре составляет 282 нм (рис. 1), что совпадает с максимумом поглощения раствора катехина. Поэтому целесообразным является определение суммы процианидинов в свежих плодах боярышника полумягкого в пересчете на катехин (рис. 2) с помощью прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 282 нм.

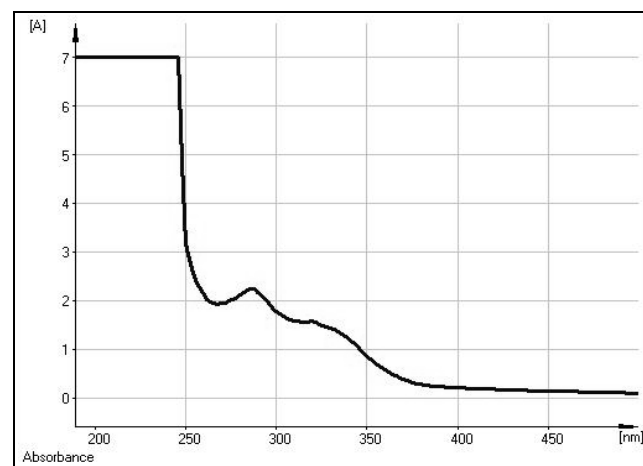


Рис. 1. Электронный спектр раствора сока из свежих плодов боярышника полумягкого

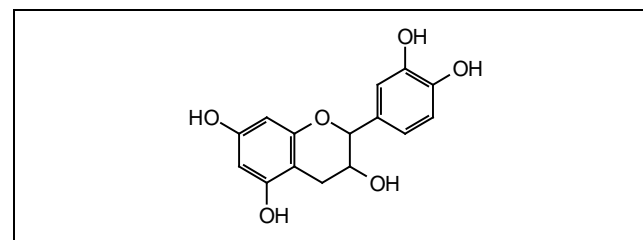


Рис. 2. Катехин

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучено влияние различных параметров на процесс экстракции. В табл. 1 представлена зависимость выхода процианидинов из свежих плодов боярышника полумягкого от концентрации экстрагента, времени термической экстракции и соотношения «сырье–экстрагент». Установлено, что оптимальными параметрами экстракции являются: однократное извлечение 70%-ным этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 60 мин в соотношении «сырье-экстрагент» – 1:30 (табл. 1).

В результате сравнительного анализа отдельных частей свежих плодов боярышника полумяг-

кого определено содержание суммы процианидинов в пересчете на катехин, %:

Косточки.....	0,49 ± 0,03
Остатки чашелистиков.....	5,12 ± 0,26
Кожица плодов	3,02 ± 0,15
Мякоть плодов	0,48 ± 0,02

Как можно заметить из полученных результатов, свежие плоды боярышника полумягкого неоднородны по содержанию суммы процианидинов. Наиболее высокое содержание процианидинов наблюдается в остатках чашелистиков и кожце плодов.

Таблица 1. Зависимость полноты извлечения суммы флавоноидов из свежих плодов боярышника полумягкого от параметров экстракции

№ п/п	Экстрагент	Соотношение сырье:экстрагент	Время экстракции, мин	Содержание суммы процианидинов в пересчете на катехин, %
1	40%-ный этиловый спирт	1:30	60 мин	0,50 ± 0,03
2	70%-ный этиловый спирт	1:30	60 мин	0,54 ± 0,03
3	96%-ный этиловый спирт	1:30	60 мин	0,49 ± 0,03
4	70%-ный этиловый спирт	1:25	30 мин	0,29 ± 0,02
5	70%-ный этиловый спирт	1:30	60 мин	0,35 ± 0,02
6	70%-ный этиловый спирт	1:30	90 мин	0,30 ± 0,02

Однако следует обратить внимание на то обстоятельство, что свежие плоды предназначены для получения сока, который локализуется в основном в мякоти свежих плодов. При этом все другие части сырья являются составными частями шрота, который получается после отжима сока и представляет интерес как потенциальное сырье для получения жидкого экстракта. С учетом этого обстоятельства для изучения параметров экстракции анализа свежих плодов боярышника полумягкого использована также мякоть свежих плодов.

Методика количественного определения суммы процианидинов в свежих плодах боярышника полумягкого. Аналитическую пробу свежих плодов боярышника полумягкого измельчают до отсутствия цельных плодов.

Около 3 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляют 90 мл 70%-ного этилово-

го спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до ±0,01, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение пропускают через бумажный фильтр с красной полосой или рыхлый комочек ваты, отбрасывая первые 5 мл, и остужают в течение 30 мин (извлечение из плодов).

Испытуемый раствор для анализа суммы процианидинов готовят следующим образом: 5 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки 70%-ным этиловым спиртом (испытуемый раствор).

Раствором сравнения является 70%-ный этиловый спирт.

Оптическую плотность измеряют при аналитической длине волны 282 нм и определенное значение оптической плотности используют в формуле расчета. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 282 нм сразу после приготовления разведения.

Содержание суммы процианидинов (X) в процентах в свежих плодах в пересчете на катехин вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times 90 \times 25}{144 \times m \times 5},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; 144 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) стандартного образца катехина при 282 нм.

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы процианидинов в свежих плодах боярышника полумягкого представлены в табл. 2. Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 5,81\%$ (табл. 3).

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность,

линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения испытуемого раствора боярышника полумягкого и катехина. Линейность методики определяли для серии растворов катехина (с концентрациями в диапазоне от 0,0010 до 0,0744 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99997. Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора катехина с известной концентрацией (25, 50 и 75%) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 98%.

С использованием разработанной методики нами проанализирован ряд образцов свежих плодов боярышника полумягкого (табл. 3). При этом определено, что содержание суммы процианидинов варьирует от 0,52 до 0,97%, что позволяет рекомендовать в качестве нижнего предела для сырья данного растения содержание суммы процианидинов не менее 0,5%.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности стандартизации свежих плодов боярышника полумягкого путем определения суммы процианидинов методом прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 282 нм в пересчете на катехин.

Таблица 2. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы процианидинов в свежих плодах боярышника полумягкого

f	\bar{x}	S	S^2	$P, \%$	$T(P, t)$	ΔX	$E, \%$
10	0,74	0,0100	0,0001	95	2,23	$\pm 0,04$	$\pm 5,81$

Таблица 3. Содержание суммы процианидинов в образцах свежих плодов боярышника полумягкого

Образец		Содержание суммы процианидинов в пересчете на катехин, %
Место сбора	Дата сбора	
Ботанический сад Самарского университета	4.09.2019 г.	0,80 \pm 0,05
	18.09. 2019 г.	0,97 \pm 0,06
	24.09.2019 г.	0,67 \pm 0,04
	26.09.2019 г.	0,52 \pm 0,03
Пос. Воскресенка, Самарская область	16.09.2019 г.	0,69 \pm 0,04

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика количественного определения суммы процианидинов в свежих плодах боярышника полумягкого методом прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 282 нм. При этом ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет 5,81%.
2. Содержание суммы процианидинов в плодах боярышника полумягкого варьирует от 0,52±0,03 до 0,97±0,06%.
3. Проведенные исследования позволяют сделать вывод о перспективности свежих плодов боярышника полумягкого как нового вида лекарственного растительного сырья для получения сока плодов и других лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Деревья и кустарники СССР. Т. 3. Издание Академии наук СССР Москва–Ленинград. 1954. 872 с.
2. Еникеева К.Е., Хасанова С.Р., Кудашкина Н.В., Андерсова П.А., Асадуллина Д.Д., Ярочкина А.Р. Выбор оптимальных условий извлечения антоциановых соединений из плодов боярышника мягковатого. Вестник Башкирского государственного медицинского университета (сетевое издание). 2018; 4:130–133.
3. Морозова Т.В., Куркин В.А., Правдивцева О.Е., Розно С.А., Жавкина Т.М. Сравнительное фитохимическое исследование плодов, побегов и цветков некоторых видов рода боярышник. Аспирантский вестник Поволжья. 2018; 1–2:22–24.
4. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Изд. 14-е. М.: Министерство здравоохранения РФ. 2018. URL: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopeia.php>.
5. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография. Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России. 2012. 290 с.
6. Патент № 2698325 (РФ). Сок из свежих плодов боярышника мягковатого, обладающего диуретической активностью. 26.08.2019.
7. Хишова О.М., Бузук Г.Н. Количественное определение процианидинов плодов боярышника. Химико-фармацевтический журнал. 2006; 2:20–22.
8. European Pharmacopoeia. 8rd Edition. Nördlingen, 2013; 1: 1456 p.

Поступила после доработки 27 января 2020 г.

DEVELOPMENT OF APPROACHES TO STANDARDIZATION OF FRESH FRUITS OF *CRATAEGUS SUBMOLLIS* SARG

© Authors, 2020

V.A. Kurkin

Dr.Sc. (Pharm.), Professor, Head of the Department of Pharmacognosy with Botany and the Basics of Phytotherapy, Samara State Medical University
E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

I.Kh. Shaikhutdinov

Postgraduate Student,
Department of Pharmacognosy with Botany and the Basics of Phytotherapy, Samara State Medical University

O.E. Pravdivtseva

Dr.Sc. (Pharm.), Associate Professor,
Department of Pharmacognosy with Botany and the Basics of Phytotherapy, Samara State Medical University

E.V. Avdeeva

Dr.Sc. (Pharm.), Professor,
Department of Pharmacognosy with Botany and the Basics of Phytotherapy, Samara State Medical University

A.V. Kurkina

Dr.Sc. (Pharm.), Associate Professor,
Department of Pharmacognosy with Botany and the Basics of Phytotherapy, Samara State Medical University

V.V. Stenyaeva

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor,
Department of Pharmacognosy with Botany and the Bases of Phytotherapy, Samara State Medical University

N.R. Varina

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor,
Department of Pharmacognosy with Botany and the Bases of Phytotherapy, Samara State Medical University

A.V. Zhdanova

Ph.D. (Pharm.), Associate Professor,
Department of General, Bioinorganic and Bioorganic chemistry, Samara State Medical University

Actuality. The fruits of *Crataegus submollis* Sarg. (family *Rosaceae*) are a popular food product, but are not currently used in medical practice. Previously, the possibility of using of the fresh fruits of *Crataegus submollis* Sarg. as a source of antidepressant and diuretic

drugs has been shown. One of the new drugs may be a juice based on fresh fruits of *Crataegus submollis* Sarg. In epy fresh fruits of the *Crataegus submollis* Sarg. predominate the reduced forms of flavonoids, namely procyanidins. An earlier analysis of the juice from fresh fruits of *Crataegus submollis* Sarg. with the using of spectrophotometry showed that the maximum absorption in the UV spectrum is 282 nm, which coincides with the maximum absorption of the solution of catechin, a biogenetic precursor of procyanidins.

The aim is the development of the method for quantitative determination of the total procyanidins in of the fresh fruits of *Crataegus submollis* Sarg.

Material and methods. The object of the study was fresh fruits of *Crataegus submollis* Sarg. harvested in September 2019 on the territory of Samara and Samara region. The method of analysis was direct spectrophotometry at a wavelength of 282 nm calculated on catechin.

Results. As a results of the study the method of quantitative determination of the total procyanidins (calculated on catechin) in fresh fruits of *Crataegus submollis* Sarg. by direct spectrophotometry at an analytical wavelength of 282 nm was developed. It was determined that the content of the total procyanidins in fresh fruits of *Crataegus submollis* Sarg. varies from $0,52 \pm 0,03\%$ to $0,97 \pm 0,06\%$ (calculated on catechin). The error of a single determination with a 95% confidence probability is $\pm 5,81\%$.

Conclusion. The highest content of procyanidins can be noted in the sepals and the skin of epy fresh fruits of *Crataegus submollis* Sarg. The fresh fruits of *Crataegus submollis* Sarg. are promising medicinal plant raw materials.

Key words: *Crataegus submollis* Sarg., fruits, flavonoids, procyanidins, catechin, spectrophotometry.

For citation: Kurkin V.A., Shaikhutdinov I.Kh., Pravdivtseva O.E., Avdeeva E.V., Kurkina A.V., Stenyaeva V.V., Varina N.R., Zhdanova A.V. Development of approaches to standardization of fresh fruits of *Crataegus submollis* Sarg. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(3):37–42. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-03-07>

REFERENCES

1. Derev'ya i kustarniki SSSR. T. 3. Izdanie Akademii nauk SSSR Moskva–Leningrad. 1954. 872 s.
2. Enikeeva K.E., Hasanova S.R., Kudashkina N.V., Andersova P.A., Asadullina D.D., Yarochkina A.R. Vybor optimal'nyh uslovij izvlecheniya antocianovyh soedinenij iz plodov boyaryshnika myagkovatogo. Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta (setevoe izdanie). 2018; 4:130–133.
3. Morozova T.V., Kurkin V.A., Pravdivtseva O.E., Rozno S.A., Zhavkina T.M. Sravnitel'noe fitohimicheskoe issle-dovanie plodov, pobegov i cvetkov nekotoryh vidov roda boyaryshnik. Aspirantskij vestnik Povolzh'ya. 2018; 1-2:22–24.
4. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossijskoj Federacii. Izd. 14-e. M.: Ministerstvo zdravoohraneniya RF. 2018. URL: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
5. Kurkina A.V. Flavonoidy farmakopejnyh rastenij: monografiya. Samara: OOO «Ofort», GBOU VPO SamGMU Minzdravsocrazvitiya Rossii. 2012. 290 s.
6. Patent № 2698325 (RF). Sok iz svezhij plodov boyaryshnika myagkovatogo, obladayushchego diureticheskoy aktivnost'yu. 26.08.2019.
7. Hishova O.M., Buzuk G.N. Kolichestvennoe opredelenie procianidinov plodov boyaryshnika. Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2006; 2:20–22.
8. European Pharmacopoeia. 8th Edition. Nördlingen, 2013; 1: 1456 p.



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский институт
 лекарственных и ароматических растений»**

приглашает к сотрудничеству
 фармпроизводителей и сельхозпредприятия
 для совместного продвижения наших научных разработок.
 Мы предлагаем лекарственные фитопрепараты к производству
 и агротехнологии лекарственных и ароматических культур
 для выращивания в различных регионах России

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Fax: 8(495)712-09-18

e-mail: vilarnii.ru

www.vilarnii.ru