

Разработка подходов к стандартизации плодов боярышника мягковатого

И.Х. Шайхутдинов, В.А. Куркин, О.Е. Правдивцева
Самарский государственный медицинский университет,
Российская Федерация, 443099, Самара, ул. Чапаевская, д. 89

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Шайхутдинов Ильнур Хясиянович – аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии Самарского государственного медицинского университета (СГМУ). Тел.: +7 (927) 753-32-76. E-mail: ilshekh@gmail.com. ORCID: 0000-0001-8784-0464

Куркин Владимир Александрович – заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СГМУ, доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (846) 260-33-59. E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-7513-9352

Правдивцева Ольга Евгеньевна – доцент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СГМУ, доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (903) 308-52-42. E-mail: pravdivtheva@mail.ru. ORCID: 0000-0003-3318-3168

РЕЗЮМЕ

Введение. В настоящее время для производства препаратов, используемых при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, разрешено использовать плоды 12 видов боярышника, однако не все из них произрастают на территории Российской Федерации. При этом в пищевой промышленности применяются плоды боярышника мягковатого (полумягкого) – *Crataegus submollis* Sarg. – широко культивируемого североамериканского вида, однако в медицинской практике он не используется. Основными действующими веществами плодов боярышника мягковатого являются флавоноиды.

Цель исследования – разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах боярышника мягковатого.

Материал и методы. Объектом исследования служили плоды боярышника мягковатого, заготовленные осенью 2018 г. на территории Самарской области. Водно-спиртовые извлечения из сырья были исследованы с помощью УФ-спектрофотометрии.

Результаты. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в плодах боярышника мягковатого методом прямой спектрофотометрии с использованием государственного стандартного образца катехина при аналитической длине волны 282 нм. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,44\%$.

Заключение. С использованием разработанной методики определено содержание суммы флавоноидов в пересчете на катехин в плодах боярышника мягковатого, которое колеблется от 4,17 до 5,35%.

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

Для цитирования: Шайхутдинов И.Х., Куркин В.А., Правдивцева О.Е. Разработка подходов к стандартизации плодов боярышника мягковатого. Фармация, 2020; 69 (6): 20–24. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-06-04>

ELABORATION OF APPROACHES TO STANDARDIZING EMERSON'S THORN (*CRATAEGUS SUBMOLLIS*) FRUITS

I.Kh. Shaikhutdinov, V.A. Kurkin, O.E. Pravdivtseva

Samara State Medical University, 89, Chapayevskaya St., Samara 443099, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Shaikhutdinov Il'nur Khisyanovich – Post graduate student of the Department of Pharmacognosy with Botany and Fundamentals of Phytotherapy, Samara State Medical University (SSMU). Tel.: +7 (927) 753-32-76. E-mail: ilshekh@gmail.com. ORCID: 0000-0001-8784-0464

Kurkin Vladimir Aleksandrovich – Head of the Department of Pharmacognosy with Botany and Fundamentals of Phytotherapy SSMU, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Tel.: +7 (846) 260-33-59. E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-7513-9352

Pravdivtseva Ol'ga Evgen'evna – Associate Professor of the Department of Pharmacognosy with Botany and Fundamentals of Phytotherapy SSMU, Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (903) 308-52-42. E-mail: pravdivtheva@mail.ru. ORCID: 0000-0003-3318-3168

SUMMARY

Introduction. The fruits of 12 hawthorn species are currently allowed for the production of drugs used to treat cardiovascular diseases, but not all of them grow widely in the Russian Federation. At the same time, the fruits of Emerson's thorn (*Crataegus submollis*

Sarg.) that is a widely cultivated North American species are widely used in the food industry, but unused in medical practice. Flavonoids are the leading group of active ingredients in Emerson's thorn fruits.

Objective: to develop a procedure for the quantitative determination of the total flavonoid content in Emerson's thorn fruits.

Materials and methods. The object of the investigation was Emerson's thorn fruits plucked in the Samara Region in the fall of 2018. Aqueous alcoholic extracts from their raw materials were studied using UV spectrophotometry.

Results. A procedure was developed for the quantitative determination of total flavonoid content in Emerson's thorn fruits by direct spectrophotometry using the state standard sample (SSS) of catechin at an analytical wavelength of 282 nm. The error of a single determination with a 95% confidence level was $\pm 4.44\%$.

Conclusion. The developed procedure was used to determine the total flavonoid content calculated with reference to catechin in Emerson's thorn fruits, which ranged from 4.17% to 5.35%.

Key words: Emerson's thorn, *Crataegus submollis* Sarg., fruits, standardization, flavonoids, catechin, spectrophotometry.

For reference: Shaikhutdinov I.Kh., Kurkin V.A., Pravdivtseva O.E. Elaboration of approaches to standardizing Emerson's thorn (*Crataegus submollis*) fruits. Farmatsiya, 2020; 69 (6): 20–24. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-06-04>

Введение

Боярышник мягковатый – растение родом из Северной Америки, которое давно применяется в РФ в декоративных и пищевых целях. Однако сырье, представляющее собой плоды, является недостаточно изученным с точки зрения химического состава. Известно о содержании в плодах аскорбиновой кислоты и антоцианов. Проведенные ранее исследования показали, что для препаратов плодов боярышника полумягкого характерна антидепрессантная активность. Для включения данного сырья в Государственную Фармакопею РФ (ГФ РФ) необходимым условием является разработка методик стандартизации [1–4].

В литературе описана методика количественного анализа, основанная на содержании суммы антоцианов в плодах боярышника мягковатого методом прямой спектрофотометрии при длине волны 543 нм [2]. Содержание суммы антоцианов в плодах боярышника полумягкого, определенное с использованием данной методики, составляет 0,023%. ГФ РФ XIV изд., для анализа сырья «Боярышника плоды» предусматривает количественное определение суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид с применением дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 410 нм $\geq 0,04\%$ [5]. Недостатками данных методик являются высокая погрешность при определении флавоноидов и невозможность определения в анализируемом сырье суммы флавоноидов в пересчете на вещества, специфические для плодов боярышника мягковатого. Следует отметить, что аналогичные методики разработаны для цветков боярышника, однако содержание суммы флавоноидов в цветках значительно больше и находится на уровне 0,5% [5–7].

Цель настоящего исследования – разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах боярышника мягковатого.

Материал и методы

Объектом исследования послужили плоды боярышника мягковатого, заготовленные в сентябре и октябре 2018 г. в Самарской области. Плоды были высушены без доступа прямых солнечных лучей. Спектральные характеристики биологически активных соединений устанавливались методом УФ-спектроскопии. При разработке методики количественного определения была применена прямая спектрофотометрия.

Результаты и обсуждение

С использованием УФ-спектроскопии установлено, что максимум поглощения для извлечения из плодов боярышника мягковатого составляет 282 нм, что соответствует катехину (см. рисунок). При изучении спектральных характеристик было выявлено, что именно катехин определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из плодов боярышника мягковатого. Кривая поглощения раствора водно-спиртового извлечения плодов боярышника коррелирует с кривой поглощения раствора катехина. Поэтому целесообразно, на наш взгляд, определять сумму флавоноидов в плодах в пересчете на катехин с помощью прямой спектрофотометрии при аналитической длине волны 282 нм.

Было изучено влияние различных параметров на процесс экстракции флавоноидов из плодов боярышника мягковатого (табл. 1): установлена зависимость выхода флавоноидов из сырья от концентрации экстрагента, времени термического настаивания и соотношения «сырье-экстрагент». Установлено, что оптимальными параметрами экстракции являются однократное извлечение 70% этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 60 мин в соотношении «сырье-экстрагент» как 1:100.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в плодах боярышника мягковатого. Аналитическую пробу высушенных плодов боярышника мягковатого измельчают до размера частиц 3 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляют 100 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до ±0,01. Колбу 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 фильтруют через бумажный фильтр с красной полосой и остужают в течение 30 мин (извлечение из плодов).

Испытуемый раствор для анализа суммы флавоноидов готовят следующим образом: 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора до метки 70% этиловым спиртом (испытуемый раствор). Раствором сравнения является 70% этиловым спиртом. Оптическую плотность измеряют при аналитической длине волны 282 нм и определенное значение оптической плотности используют в формуле расчета.

Для расчета содержания суммы флавоноидов готовят раствор стандартного образца катехина, измеряют его оптическую плотность при аналитической длине волны 282 нм.

Содержание суммы флавоноидов (X%) в пересчете на катехин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

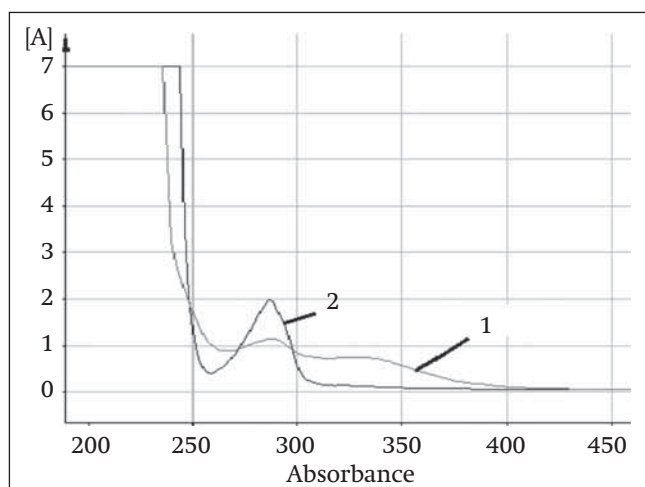
$$X = \frac{D \times m_0 \times 100 \times 5 \times 25 \times 100 \times 100}{D_0 \times m \times 25 \times 25 \times 2 \times (100 - W)}$$

где: D – оптическая плотность испытуемого раствора; D₀ – оптическая плотность раствора СО катехина; m – масса сырья, г; m₀ – масса СО катехина, г; W – потеря в массе при высушивании, %.

При отсутствии СО катехина содержание суммы флавоноидов (X%) в пересчете на катехин и абсолютно сухое сырье для расчета целесообразно использовать теоретическое значение его удельного показателя поглощения, равное 144:

$$X = \frac{D \times 100 \times 25 \times 100}{144 \times m \times 2 \times (100 - W)}$$

где: D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; 144 – удельный показатель поглощения (E_{1%^{1cm}}) СО катехина при 282 нм; W – потеря в массе при высушивании, %.



УФ-спектры спиртовых растворов катехина и извлечения из плодов боярышника мягковатого
 Примечание. 1 – раствор водно-спиртового извлечения из плодов боярышника полумягкого 1:625; 2 – раствор катехина в спирте этиловом 1:8000.
 UV spectra of alcoholic catechin solutions and Emerson's thorn fruit extracts
 Note. 1 – solution of aqueous alcoholic extract from Emerson's thorn fruits (1:625); 2 – ethanol solution of catechin (1: 8000).

Таблица 1
 Зависимость полноты извлечения суммы флавоноидов из плодов боярышника мягковатого

Table 1
 Dependence of the completeness of extraction of total flavonoid content from Emerson's thorn fruits

№	Концентрация экстрагента – этилового спирта, %	Соотношение сырья: экстрагент	Время экстракции, мин	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на катехин и абсолютно сухое сырье, %
1	40	1:50	60	3,38±0,15
2	70	1:50	60	3,54±0,16
3	96	1:50	60	2,22±0,10
4	70	1:50	30	3,47±0,15
5	70	1:50	90	4,04±0,18
6	70	1:25	60	3,87±0,17
7	70	1:100	60	4,93±0,22

Приготовление раствора стандартного образца катехина. Около 0,003 г (точная навеска) катехина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 96% этиловом спирте. Затем содержимое колбы доводят 96% этиловым спиртом до метки (раствор А катехина). После чего 5 мл раствора А катехина помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят раствор до метки 70% этиловым спиртом. Раствором сравнения является 70% этиловый спирт. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 282 нм сразу после приготовления все растворов.

Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 4,44\%$ (табл. 2).

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность,

линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики устанавливали по соотношению максимумов поглощения комплекса флавоноидов плодов боярышника мягковатого 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%.

Анализ образцов плодов боярышника мягковатого с использованием разработанной методики (табл. 3) показал, что содержание суммы флавоноидов в сырье колеблется от 4,17 до 5,35%, что позволяет рекомендовать в качестве нижнего предела для сырья данного растения содержание суммы флавоноидов $\geq 4,0\%$.

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

Таблица 2

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах боярышника мягковатого

Table 2

Metrological characteristics of the procedure for quantitative determination of total flavonoid content in Emerson's thorn fruits

f	\bar{X}	S	P, %	t (P, f)	$\pm X$	E, %
10	4,21	0,0672	95	2,23	$\pm 0,19$	$\pm 4,44$

Содержание суммы флавоноидов в плодах боярышника мягковатого

Total flavonoid content in Emerson's thorn fruits

№	Характеристика образца сырья	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на катехин и абсолютно сухое сырье, %
1.	Плоды боярышника мягковатого, высушенные при комнатной температуре (октябрь 2018, Ботанический сад)	4,17 \pm 0,19
2.	Плоды боярышника мягковатого, высушенные при температуре 50°C (октябрь 2018, Ботанический сад)	4,22 \pm 0,19
3.	Плоды боярышника полумягкого (сентябрь 2018, Ботанический сад)	5,35 \pm 0,24
4.	Плоды боярышника полумягкого (сентябрь 2018, пос. Антоновка Самарская обл.)	4,32 \pm 0,19

Таблица 3

Table 3

Заключение

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на катехин в плодах боярышника мягковатого методом прямой спектрофотометрии с использованием государственного стандартного образца катехина при аналитической длине волны 282 нм. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет 4,44%. Содержание суммы флавоноидов для плодов боярышника мягковатого варьирует от 4,17 до 5,35%. Проведенные исследования позволяют говорить о перспективности плодов боярышника мягковатого в качестве нового вида лекарственного растительного сырья.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература

1. Деревья и кустарники СССР. М.-Л.: Издание Академии наук СССР, 1954; 3: 872.
2. Еникеева К.Е., Хасанова С.Р., Кудашкина Н.В. и др. Выбор оптимальных условий извлечения антоциановых соединений из плодов боярышника мягковатого. Вестник Башкирского государственного медицинского университета. 2018; 4: 130–3.
3. Морозова Т.В., Куркин В.А., Правдивцева О.Е. и др. Сравнительное фитохимическое исследование плодов, побегов и цветков некоторых видов рода боярышник. Аспирантский вестник Поволжья. 2018; 1–2: 22–4.
4. Морозова Т.В., Куркин В.А., Зайцева Е.Н. и др. Изучение антидепрессантных свойств жидких экстрактов на основе сырья боярышника полумягкого. Вестник Башкирского государственного медицинского университета. 2018; 4: 150–5.
5. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. [Электронное издание]. Режим доступа: <http://femb.ru/feml>
6. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений. Самара: ООО «Офорт», Сам ГМУ, 2012; 290.
7. Куркина А.В. Новые подходы к стандартизации цветков боярышника. Химия растительного сырья. 2013; 2: 171–6.

References

1. Trees and shrubs of the USSR. Moscow-Leningrad, Edition of the USSR Academy of Sciences, 1954; 3: 872 (In Russian).

2. Enikeeva K.I., Khasanova S.R., Kudashkina N.V. et al. Selecting the optimal terms of extraction antocian compounds from the fruit of the hawthorn soft. Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. 2018; 4: 130–3 (in Russian).
3. Morozova T.V., Kurkin V.A., Pravdivtseva O.E. et al. The content of total flavonoids in the fruits and shoots of some hawthorn species. Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya. 2018; 1–2: 22–4 (in Russian).
4. Morozova T.V., Kurkin V.A., Zaitceva E.N. et al. Study of antidepressant properties of the liquid extracts based on raw materials of Crataegus submollis SARG. Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. 2018; 4: 150–5 (in Russian).
5. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. [Electronic resource]. Access mode: <http://femb.ru/feml> (In Russian).
6. Kurkina A.V. Flavonoids of pharmacopoeial plants. Samara: Ofort, SamGMU, 2012; 290 (In Russian).
7. Kurkina A.V. New approaches of standardization of hawthorn flowers. Khimiya rastitel'nogo syr'ya. 2013; 2: 171–6 (In Russian).

Поступила 7 сентября 2020г.

Received 7 September 2020

Принята к публикации 15 сентября 2020 г.

Accepted 15 September 2020