

УДК 615.322:547.9-001.6

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

DOI: 10.37903/vsgma.2025.1.26 EDN: WJGFQI

**РАЗРАБОТКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ПОБЕГАХ *CRATAEGUS PINNATIFIDA BUNGE* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОЛОГИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО КОМПОЗИЦИОННОГО ПЛАНА**

© Мечикова Г.Я., Толстенок И.В.

Дальневосточный государственный медицинский университет, Россия, 680000, Хабаровск,  
ул. Муравьева-Амурского, 35

*Резюме*

**Цель.** Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в побегах боярышника перистонадрезанного с использованием дифференциальной спектрофотометрии.

**Методика.** Объектами исследования служили побеги боярышника перистонадрезанного, собранные в фазу цветения. Сыре собирали в природных популяциях Хабаровского края в 2023 г. Для количественного определения флавоноидов использовали метод дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на гиперозид. В качестве экстрагента использовали спирт этиловый. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре UV-1700, Shimadzu (Япония).

**Результаты.** В результате исследований определены оптимальные значения параметров реакции образования комплексов флавоноидов боярышника перистонадрезанного с алюминия хлоридом. С помощью центрального композиционного плана второго порядка типа  $2^2$  установлены оптимальные условия полной экстракции флавоноидов из сырья боярышника перистонадрезанного: экстрагент – спирт этиловый 83,5%; соотношение сырья к экстрагенту – 1:123. Ошибка разработанной методики не превышает 5%.

**Заключение.** Разработана методика определения суммы флавоноидов в побегах боярышника перистонадрезанного в пересчете на гиперозид с использованием дифференциальной спектрофотометрии.

**Ключевые слова:** боярышник перистонадрезанный, *Crataegus pinnatifida* Bunge, стандартизация, центральный комплексный план, гиперозид, флавоноиды, дифференциальная спектрофотометрия

DEVELOPMENT OF A SPECTROPHOTOMETRIC TECHNIQUE FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN SHOOTS OF *CRATAEGUS PINNATIFIDA BUNGE* USING THE CENTRAL COMPOSITIONAL PLAN METHODOLOGY

Mechikova G.Ya., Tolstenok I.V.

Far-Eastern State Medical University, Muravyov-Amursky St., 35, 680000, Khabarovsk, Russia

*Abstract*

**Objective.** Development of a technique for quantitative determination of the flavonoids sum in shoots of *Crataegus pinnatifida* Bunge using differential spectrophotometry.

**Methods.** The shoots of *Crataegus pinnatifida* Bunge collected in the flowering phase served as the objects of the study. Raw materials were collected from natural populations in Khabarovsk Krai in 2023. Differential spectrophotometry method was used for quantitative determination of flavonoids in terms of hyperoside. Optical density was measured on a UV-1700 spectrophotometer, Shimadzu (Japan). Ethyl alcohol was used as an extractant.

**Results.** The optimal values of reaction factors for the formation of complexes of flavonoids of *Crataegus pinnatifida* Bunge with aluminum chloride were determined as a result of the studies. The optimal conditions for complete extraction of flavonoids from raw materials of *Crataegus pinnatifida* Bunge were established using a second-order type  $2^2$  central compositional plan: extractant – ethyl alcohol 83,5%; raw material to extractant ratio – 1:123. The error of the developed methodology does not exceed 5%.

**Conclusions.** The methodology for determination of the sum of flavonoids in shoots of *Crataegus pinnatifida* Bunge in recalculation to hyperoside using differential spectrophotometry was developed.

**Keywords:** *Crataegus pinnatifida* Bunge, standardization, centralized comprehensive plan, hyperoside, flavonoids, differential spectrophotometry

## Введение

Боярышник перистонадрезанный (*Crataegus pinnatifida* Bunge) – кустарник или небольшое дерево, вид рода боярышник (*Crataegus*) из семейства розоцветных (*Rosaceae*). В России естественно произрастает на Дальнем Востоке в Приморье и Приамурье (бассейн среднего и нижнего Амура и Уссури), а за ее пределами в Корее и Китае (северные районы, включая Маньчжурию) [4]. Современные фармакологические эксперименты *in vitro* и *in vivo*, а также клинические исследования показали, что боярышник перистонадрезанный обладает разнообразными биологическими эффектами и препараты на его основе могут быть использованы для лечения сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, эндокринных, бактериальных и др. заболеваний [5-11]. Широкий спектр фармакотерапевтической активности вида обеспечивается различными классами природными соединениями, среди которых наиболее распространенными и важными активными компонентами рассматриваются флавоноиды и их производные [8].

Боярышник перистонадрезанный имеет долгую историю использования в качестве лекарственного растения в Китае и включен в Китайскую фармакопею. К сожалению, боярышник перистонадрезанный не входит в перечень официальных видов, разрешенных к применению в России. Между тем, с точки зрения ресурсного потенциала и высокой биологической активности этот дальневосточный вид представляет научно-практический интерес и заслуживает внимания отечественной официальной медицины. На кафедре фармации и фармакологии Дальневосточного государственного медицинского университета проводятся многопрофильные фармакологические и фармакогностические исследования боярышника перистонадрезанного с целью включения его в медицинскую практику. Среди прочего решаются вопросы и стандартизации сырья этого вида. В этой связи актуальным являются исследования по разработке методик количественного определения биологически активных веществ в сырье боярышника перистонадрезанного.

Цель исследования – разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в побегах боярышника перистонадрезанного с использованием дифференциальной спектрофотометрии.

## Методика

В качестве объекта исследования служили побеги боярышника перистонадрезанного, собранные в фазу начала цветения. Сбор сырья проводили в естественных природных популяциях Хабаровского края (с. Бычиха, Хабаровский район) в 2023 г. С точки зрения морфологии исследуемое сырье представляет собой верхушки ветвей с зелеными стеблями, листьями, цветками и бутонами. Поэтому с целью достижения однородности аналитической навески сырья для проведения экстракции априори использовали сырье, измельченное до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Выбор указанной степени измельчения подтверждается и данными литературы [2].

Для количественного определения флавоноидов использовали метод дифференциальной спектрофотометрии. Метод основан на реакции комплексообразования флавоноидных соединений с алюминия хлоридом. Данный метод предполагает использование в качестве контроля испытуемый раствор без реагента (алюминия хлорида), что приводит к уменьшению влияния сопутствующих веществ. Содержание суммы флавоноидов рассчитывали в эквиваленте на гиперозид, так как этот флавоноид является одним из основных в биологически активном комплексе боярышника перистонадрезанного [5, 8]. В расчетах использовали удельный показатель поглощения гиперозида [3].

Исследования проводили в соответствии со следующей методикой. Точные навески измельченного сырья (0,25; 0,50; 1,00; 2,00) помещали в колбы со шлифом, прибавляли по 50 мл спирта этилового (50%; 60%; 70%; 80%; 90%; 95%) и взвешивали с погрешностью  $\pm 0,01$  г. Колбы присоединяли к обратным холодильникам и экстрагировали на кипящей водяной бане в течение 15, 30, 45 и 60 мин. Затем колбы с извлечениями охлаждали, взвешивали и доводили до

первоначальной массы соответствующим экстрагентом. Извлечения фильтровали через обеззоленные фильтры (красная лента), отбрасывали первые 10 мл фильтрата (испытуемые растворы А). Далее определенный объем испытуемых растворов А помещали в мерные колбы вместимостью 25 мл, прибавляли раствор алюминия хлорида 3% в спирте этиловом 70% – 1, 2, 3 и 4 мл, доводили до метки спиртом этиловым 70% и перемешивали (испытуемые растворы Б). Оптическую плотность испытуемых растворов Б измеряли через 15, 30, 45 и 60 мин на спектрофотометре при длине волн 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из испытуемого раствора А, доведенного спиртом этиловым 70% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид в абсолютно сухом сырье боярышника перистонадрезанного в процентах (Х) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{A_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot a \cdot V \cdot (100 - W)} A_{1\text{ см}}^{1\%}$$

, где А – оптическая плотность испытуемого раствора Б;  $A_{1\text{ см}}^{1\%}$  – удельный показатель поглощения комплекса гиперозида с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 330; V – объем аликвоты экстракта, мл; a – навеска сырья, г; W – влажность сырья, %.

Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре UV-1700, Shimadzu (Япония). Каждый опыт в эксперименте проводили в трех повторностях. Статистическую обработку результатов исследований и построение графической зависимости осуществляли с помощью пакетов прикладных компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 10.0.

## Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследований было изучено влияния факторов реакции образования комплексов флавоноидов с алюминия хлоридом – оптимальное количество реагента, время реакции и стабильность комплекса. Требуемое количество реагента было определено экспериментально по максимальному выходу продукта реакции, то есть по максимальному светопоглощению на серии растворов. Установлено, что количество 3% спиртового раствора алюминия хлорида, обеспечивающее полноту образования комплекса, при самом максимальном содержании флавоноидов в конечном разведении (оптическая плотность около 0,9-1,0) составляет 2 мл. Реакция комплексообразования развивается в течение 20 мин, как минимум 60 мин комплекс остается стабильным.

На следующем этапе разработки методики были исследованы параметры экстракции флавоноидов. Тестируемые переменные включали: концентрацию этилового спирта (50%; 60%; 70%; 80%; 90%; 95%), соотношение сырья к экстрагенту (0,25; 0,50; 1,00; 2,00), время экстракции в минутах (15, 30, 45 и 60 мин.). Дизайн эксперимента предполагал изменение одного параметра при постоянном уровне двух других. Результаты исследований представлены на рис. 1.

Как видно (рис. 1А), время экстракции не влияет на выход флавоноидов из сырья. Между тем, однофакторный анализ (рис. 1А и 1Б) показал, что соотношение сырья к экстрагенту и концентрация спирта этилового влияют на экстракцию флавоноидов (рис. 1Б). Выход флавоноидов из сырья (рис. 1Б) достоверно увеличивается при повышении концентрации спирта этилового (интервал от 50% до 80%), последующее увеличение концентрации экстрагента показало снижение содержания флавоноидов в экстракте. Установлено, что объем этилового спирта по отношению к количеству экстрагируемого растительного материала характеризуется положительным прямо пропорциональным соотношением в ряду 1:25-1:50-1:100 (рис. 1А). При соотношении сырья к экстрагенту 1:100 зафиксирован максимальный выход флавоноидов в экстракт, при дальнейшем увеличении объема спирта этилового (1:200) достоверных различий в содержании исследуемой группы веществ в экстракте не обнаружено.

Для оптимизации экстракции флавоноидов из побегов боярышника перистонадрезанного далее была использована 3-х уровневая 2-х факторная методология центрального композиционного ортогонального плана (ЦКОП) второго порядка типа  $2^2$ . Значение «звездного» плеча  $a=1$ . Центральный композиционный план относится к группе методов планирования, позволяющий проводить исследования по оптимизации условий с наименьшим количеством экспериментов и с меньшими затратами времени и ресурсов [1].

В соответствии с результатами однофакторного анализа (рис. 1) в качестве параметров для последующей оптимизации экстракции были выбраны: соотношение сырья к экстрагенту ( $X_1=1:25; 1:100; 1:175$ ), концентрация этилового спирта ( $X_2=65\%; 80; 95\%$ ). Схема эксперимента приведена в таблице 1 в кодированном и фактическом уровнях указанных двух переменных. Экспериментальный план состоял из 9 опытов, включая одну центральную точку. В качестве функции отклика ( $Y$ ) процесса экстракции использовали соответственно сумму флавоноидов в пересчете на гиперозид в абсолютно сухом сырье.

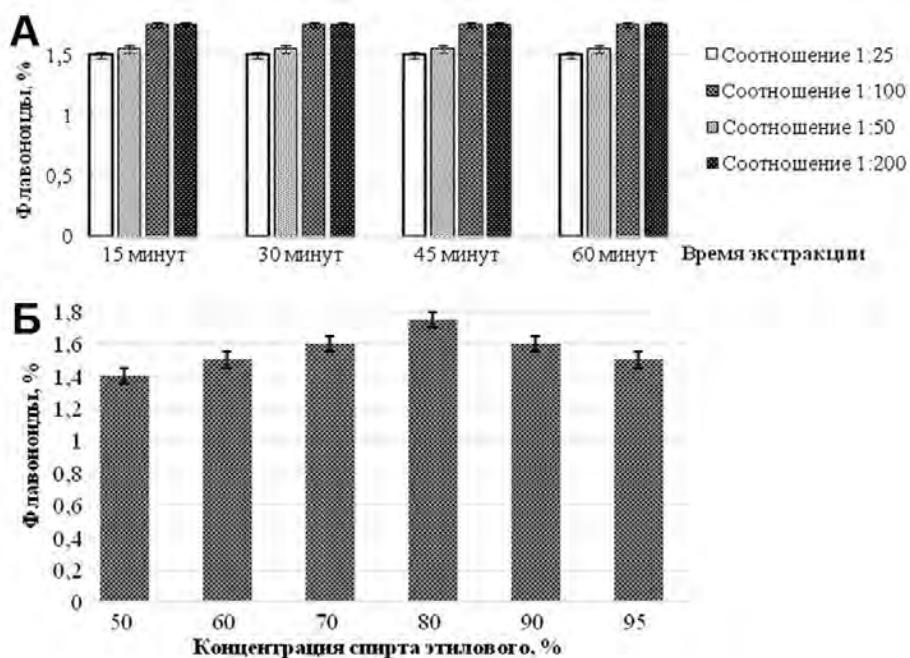


Рис. 1. Однофакторный анализ экстракции флавоноидов из побегов боярышника перистонадрезанного: А – время экстракции и соотношение сырья к экстрагенту; Б – концентрация спирта этилового

Таблица 1. Конструкция ЦКОП и соответствующие значения отклика при экстракции флавоноидов из побегов боярышника перистонадрезанного

№	Матрица планирования					Рабочая матрица		Отклик, %	
	$X_1$	$X_2$	$X_{12}$	$(X_1)^2$	$(X_2)^2$	Соотношение сырья к экстрагенту	Содержание спирта, %	$Y_{ср.эксп.}$	$Y_{расч.}$
1	-	-	+	$1/3$	$1/3$	1:25	65	1,45	1,46
2	+	-	-	$1/3$	$1/3$	1:175	65	1,52	1,51
3	-	+	-	$1/3$	$1/3$	1:25	95	1,58	1,59
4	+	+	+	$1/3$	$1/3$	1:175	95	1,67	1,67
5	-	0	0	$1/3$	$-2/3$	1:25	80	1,67	1,65
6	+	0	0	$1/3$	$-2/3$	1:175	80	1,75	1,76
7	0	-	0	$-2/3$	$1/3$	1:100	65	1,55	1,55
8	0	+	0	$-2/3$	$1/3$	1:100	95	1,70	1,69
9	0	0	0	$-2/3$	$-2/3$	1:100	80	1,78	1,79

Примечание: время экстракции во всех опытах составляло 30 минут

Регрессионный анализ экспериментальных данных (табл. 2) позволил получить математическую модель, которая отражает влияние факторов экстракции на функцию отклика в виде полинома второй степени:

$$Y = 1,6300 + 0,0400X_1 + 0,0717X_2 + 0,0075X_{12} - 0,0703(X_1)^2 - 0,1553(X_2)^2$$

Таблица 2. Расчет и анализ математической модели экстракции флавоноидов из побегов боярышника перистонадрезанного

Этапы	Статистические характеристики		Результаты
Проверка гипотезы об однородности дисперсий	Критерий Кохрена		$G_{\text{эксп.}}$ 0,2264 $G_{0,95(2;9)}$ 0,4775
	свободный коэффициент	$b_0$	1,6300
Расчет коэффициентов математической модели	линейные коэффициенты	$b_1$	0,0400
	коэффициент парного взаимодействия	$b_{12}$	0,0075
	центрированные квадратичные коэффициенты	$b_{11}$	-0,0703
		$b_{22}$	-0,1553
	Дисперсия воспроизводимости		0,0006
	Дисперсии коэффициентов регрессии		$S_{b_0}^2$ 0,00019 $S_{b_1}^2 = S_{b_2}^2$ 0,00024 $S_{b_{12}}^2$ 0,00029 $S_{b_{11}}^2 = S_{b_{22}}^2$ 0,00042
Проверка значимости коэффициентов уравнения регрессии	Значение t-соотношения $t_{0,95(18)}=2,10$		$t_0 = 8150$ $t_1 = 17$ $t_2 = 299$ $t_{12} = 25$ $t_{11} = 168$ $t_{22} = 370$
	Дисперсия адекватности		0,001
Проверка гипотезы об адекватности математической модели	Критерий Фишера		$F_{\text{эксп.}}$ 1,69 $F_{0,95(3;18)}$ 3,16

На рис. 2 продемонстрирована точность модели и ее возможность прогнозирования. На основании анализа данных (табл. 2, рис. 2), установлено, что полученная математическая модель адекватна ( $F_{\text{эксп.}} < F_{0,95(3;18)}$ ) и отражает взаимосвязь между исследуемыми переменными в процессе экстракции флавоноидов из сырья боярышника перистонадрезанного в заданных интервалах варьирования факторов. Все коэффициенты, отражающие процесс экстракции, являются значимыми при доверительной вероятности 0,95.

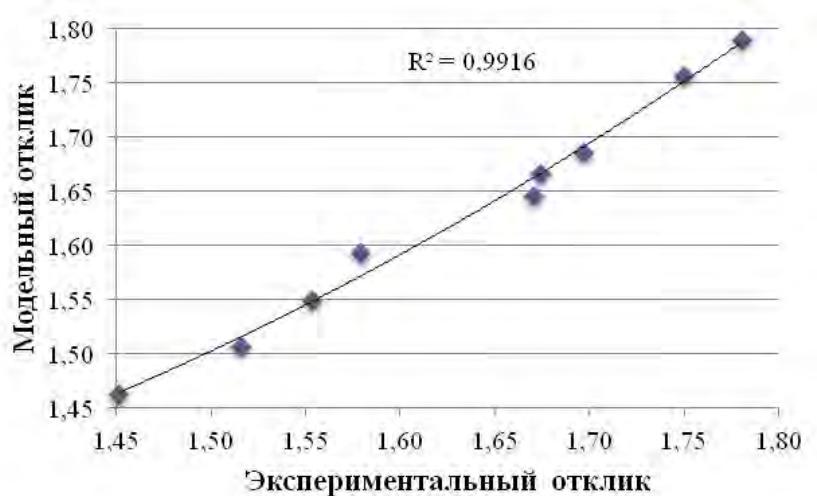


Рис. 2. Сравнение экспериментальных и модельных откликов экстракции флавоноидов из побегов боярышника перистонадрезанного

Влияние линейных коэффициентов регрессии (0,0400; 0,0717) и коэффициента парного взаимодействия (0,0075) прямо пропорционально общей сумме флавоноидов. Что говорит о том, что увеличение объема экстрагента и его концентрации по отношению к экстрагируемому растительному материалу увеличивает выход флавоноидов из сырья. В то время как центрированные квадратичные коэффициенты (-0,0703; -0,1553) оказывают обратно пропорциональный эффект. На рисунке 3 представлена 3D модель поверхности отклика, отражающая зависимость выхода флавоноидов от концентрации этилового спирта и соотношения сырья к экстрагенту.

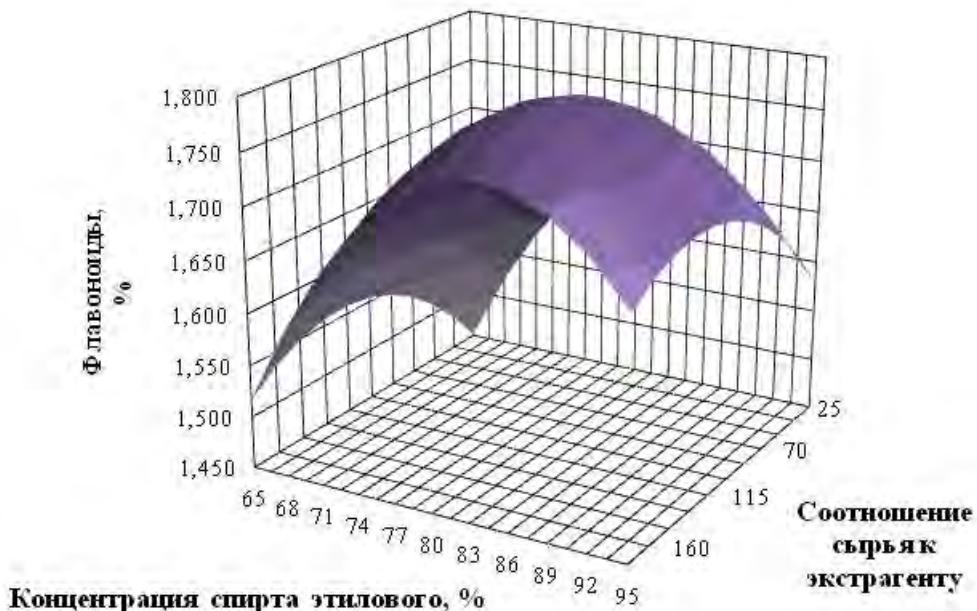


Рис. 3. 3D модель поверхности отклика, отражающая зависимость выхода флавоноидов от концентрации этилового спирта и соотношения сырья к экстрагенту

Максимальное значение отклика в модельном эксперименте – 1,795%. В декодированном виде это соответствует соотношению сырья к экстрагенту 1:123 и концентрации спирта этилового 83,5%. Максимальный выход флавоноидов в условиях эксперимента составил  $1,803 \pm 0,03\%$ . Также установлено, что увеличение кратности экстракции не влияет на выход флавоноидов.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов установлены условия и проведена метрологическая оценка методики количественного определения суммы флавоноидов в побегах боярышника перистонадрезанного с использованием дифференциальной спектрофотометрии (табл. 3). Как следует из таблицы 3, относительная ошибка методики с доверительной вероятностью 95% составляет не более 5%, т.е. находится в пределах случайной ошибки разработанной методики.

Таблица 3. Условия методики количественного определения суммы флавоноидов в побегах боярышника перистонадрезанного с использованием дифференциальной спектрофотометрии

Параметры методики	Оптимальные значения параметров	Метрологическая характеристика методики
Измельченность, мм	1	$x_{cp} = 1,80$
Соотношение сырья к экстрагенту	1:123	$S = 0,0314$
Концентрация спирта этилового, %	83,5	$S^2 = 0,00098$
Время экстракции, мин	30	$P, \% = 95$
Кратность экстракции	1	$t(P, f) = 2,57$
Объем аликовты, мл	2	$\Delta x = 0,081$
Количество 3% спиртового раствора алюминия хлорида, мл	2	$\varepsilon, \% = 4,48$
Время реакции комплексообразования, мин	30	

## Заключение

Подобраны оптимальные условия и разработана методика определения суммы флавоноидов в побегах боярышника перистонадрезанного в пересчете на гиперозид с использованием дифференциальной спектрофотометрии.

## Литература (references)

- Грачев Ю.П., Плаксин Ю.М. Математические методы планирования эксперимента. – М.: Де Ли Принт, 2005. – 296 с. [Grachev Yu.P., Plaksin Yu.M. *Matematicheskiye metody planirovaniya eksperimenta. Mathematical methods of experiment planning.* – Moscow: DeLi Print, 2005. – 296 p. (in Russian)]
- Жалалова Н.К., Хасanova С.Р., Кудашкина Н.В. Разработка методики количественного определения флавоноидов в побегах *Crataegus Almaatensis* Pojark // Башкирский химический журнал. – 2021. – Т.28, №1. – С. 83-89. [Zhalaeva N.K., Khasanova S.R., Kudashkina N.V. *Bashkirskiy khimicheskiy zhurnal. Bashkir Chemical Journal.* – 2021. – V.28, N1. – P. 83-89. (in Russian)]
- Куркин В.А., Правдинцева О.Е., Морозова Т.В. и др. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в цветках боярышника полумягкого // Химия растительного сырья. – 2019. – №3. – С. 137-144. [Kurkin V.A., Pravdivtseva O.E., Morozova T.V., i dr. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya. Chemistry of Plant Raw Materials.* – 2019. – N3. – P. 137-144. (in Russian)]
- Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). – СПб: Мир и семья, 1995. – 992 с. [Cherepanov S.K. *Sosudistyye rasteniya Rossii i sopredel'nykh gosudarstv (v predelakh byvshego SSSR).* Vascular plants of Russia and neighboring countries (within the former USSR). – Saint-Petersburg: Mir i sem'ya, 1995. – 992 p. (in Russian)]
- Chang C.L., Chen H.S., Shen Y.C. et al. Phytochemical composition, antioxidant activity and neuroprotective effect of *Crataegus pinnatifida* fruit // South African Journal of Botany. – 2013. – V.88. – P. 432-437.
- Dehghani S., Mehri S., Hosseinzadeh H. The effects of *Crataegus pinnatifida* (Chinese hawthorn) on metabolic syndrome: a review // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. – 2019. – V.22, N5. – P. 460-468.
- Lin H.H., Charles A.L., Hsieh C.W. et al. Antioxidant effects of 14 Chinese traditional medicinal herbs against human low-density lipoprotein oxidation // Journal of Traditional and Complementary Medicine. – 2015. – V.5, N1. – P. 51-55.
- Li R., Luan F., Zhao Y. et al. *Crataegus pinnatifida*: a botanical, ethnopharmacological, phytochemical, and pharmacological overview // Journal of Ethnopharmacology. – 2023. – V.301. – P. 28.
- Wang T., An Y., Zhao C. et al. Regulation effects of *Crataegus pinnatifida* leaf on glucose and lipids metabolism // Journal of Agricultural Food Chemistry. – 2011. – V.59, N9. – P. 4987-4994.
- Wu J., Peng W., Qin R. et al. *Crataegus pinnatifida*: chemical constituents, pharmacology and potential applications // Molecules. – 2014. – V.19. – P. 1685-1712.
- Zhang L.L., Zhang L.F., Xu J.G. Chemical composition, antibacterial activity and action mechanism of different extracts from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.) // Scientific Reports. – 2020. – V.10, N1. – 8876. – P. 13.

## Информация об авторах

Мечикова Галина Ярославовна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармации и фармакологии ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: galina.m.ya@mail.ru

Толстенок Иван Владимирович – кандидат биологических наук, доцент кафедры химии ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: toiv@bk.ru

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.10.2024

Принята к печати 20.03.2025