

УДК 577.1. 577.352.34

## ИЗУЧЕНИЕ ФЛАВОНОИДНОГО СОСТАВА И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИСТЬЕВ БОЯРЫШНИКА ПОНТИЙСКОГО *CRATAEGUS PONTICA*

© *К.В. Раимова\**, *Н.Г. Абдулладжанова*, *Ф.Н. Тошпулатов*, *Н.А. Эргашев*, *А.Д. Матчанов*

*Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова АН РУз,  
ул. Мирзо Улугбека, 83, Ташкент, 100125 (Республика Узбекистан),  
e-mail: k.raimova\_81@mail.ru*

Приведены результаты исследований содержания полифенольных соединений и их антиоксидантной активности в растении Боярышника понтийского *Crataegus pontica* К. Koch., произрастающего в горных районах Ташкентской области Республики Узбекистан. Сбор сырья проходил осенью в начале октября 2019 года и весной в конце апреля 2020 года. Подобраны условия выделения полифенольных соединений листьев боярышника при различных условиях. Показано, что оптимальное содержание полифенолов экстрагируется 70%-ным ацетоном, с последующим фракционированием водного остатка этилацетатом и осаждением гексаном. Было показано, что в растениях, собранных весной, выход суммы полифенолов составил 4.28%, а собранных осенью – 2.6% от воздушно-сухой массы сырья. Хроматографическими методами (БХ и ТСХ) выявлено, что в составе листьев растений, собранных весной, полифенолов больше, чем собранных осенью. В составе этого растения обнаружены соединения, относящиеся к классу флавонолов, фенолкислот и флаван-3-олов. Методами БХ и ТСХ полифенолы были идентифицированы как рутин, кверцетин, гиперозид, катехин и галловая кислота.

Также изучена антиоксидантная активность суммы полифенольных соединений при модели перекисного окисления липидов (ПОЛ) в митохондриях печени крыс. Установлено, что полифенолы оказывают протекторное действие на митохондрии, уменьшая повреждающее действие  $Fe^{2+}$ /аскорбат, и антиоксидантная активность зависит от концентрации изученных полифенольных веществ. Внесение в инкубационную среду рутина в концентрации 5 мкМ ингибирует процессы ПОЛ на 32.0%, а при 10 мкМ – на 85.9% и в 20 мкМ – на 96.8% по сравнению с контролем.

*Ключевые слова:* полифенолы, экстракция, *Crataegus pontica*, ПОЛ, антиоксидантная активность.

### **Введение**

В последнее время ученые разных специальностей приходят к выводу, что на основе многих патологических процессов в организме, приводящих к различным заболеваниям и в конечном итоге к старению, лежит один и тот же процесс. Это повреждение клеточных оболочек и других структур внутри клетки сво-

*Раимова Камола Вахабджанова* – базовый докторант,  
e-mail: k.raimova\_81@mail.ru

*Абдулладжанова Нодира Гуломжановна* – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник экспериментально-технологической лаборатории,  
e-mail: k.raimova\_81@mail.ru

*Тошпулатов Фаррух Назимович* – младший научный сотрудник лаборатории низкомолекулярных биологически активных соединений,  
e-mail: k.raimova\_81@mail.ru

*Эргашев Нурали Аъзамович* – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,  
e-mail: k.raimova\_81@mail.ru

*Матчанов Алимжан Давлатбаевич* – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник экспериментально-технологической лаборатории,  
e-mail: k.raimova\_81@mail.ru

бодными радикалами кислорода. В зависимости от того, какие структуры повреждены – наследственное вещество (ДНК) или наружная мембрана, либо развиваются онкологические заболевания, либо наблюдаются другие патологические нарушения. По мере старения организма активность свободных радикалов возрастает и риск различных возрастных заболеваний увеличивается [1]. Большой интерес к изучению полифенолов вызван тем обстоятельством, что эти соединения способны снижать риск развития атеросклероза, онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний, а также возникновения мутаций. Принято считать, что подоб-

\* Автор, с которым следует вести переписку.

ные свойства объясняются высокой антиоксидантной активностью полифенолов. В результате эти соединения способны ингибировать процессы радикально-цепного окисления в организме, защищая биомолекулы от окисления (активация липопероксидации – ведущий патогенетический фактор развития типовых патологических процессов и заболеваний различной этиологии [2]). Растение рода Боярышника (*Crataegus*, сем. *Розоцветные – Rosaceae*) является широко распространенным во всем мире. В природе встречается до 900 видов этого растения. 10 из них произрастают на территории Узбекистана. Боярышник понтийский цветет в мае-июне, в начале октября созревают плоды [3]. Боярышник – отличное сердечное средство. Препараты на основе цветков и плодов боярышника применяются в научной и народной медицине, в качестве кардиотонических средств [4, 5]. В современной медицине экспериментально установлено, что галеновые препараты (настойка, жидкий экстракт, настой цветков и плодов) оказывают, главным образом, кардиотоническое действие – улучшают сократительную способность сердца, особенно это действие проявляется на фоне ослабленной функции сердца [6].

Боярышник содержит большой комплекс биологических активных веществ – флавоноидов, холин, ацетилхолин, дубильные вещества, фитостерины, тритерпеновые кислоты. Это позволяет им усиливать кровообращение в коронарных сосудах сердца и головного мозга, повышает сокращения сердечной мышцы, вместе с тем уменьшая ее возбудимость, благодаря чему эти фитопрепараты широко применяются при функциональных расстройствах сердечной деятельности и ангионеврозах [3, 5]. Современные представления о функциональном питании подразумевают снабжение человеческого организма определенным количеством витаминов и минеральными веществами. Поскольку организм человека не может самостоятельно производить большинство витаминов и минеральных веществ, они должны поступать вместе с пищей [7]. Экстракт боярышника содержит сумму биологических активных флавоноидов: витексина, витексин-2-О-рамнозида, рутин и гиперозида, которые имеют близкие хромофорные, элюационные и другие аналитические свойства, что затрудняет их совместное определение в растительной матрице сложного состава [8]. Стандартизацию плодов боярышника осуществляют по содержанию флавоноидов (не менее 0.06% в пересчете на гиперозид), однако методика количественного определения суммы флавоноидов в сырье данного растения крайне сложна и многостадийна, что неизбежно может приводить к потере анализируемых веществ и, следовательно, к занижению результатов анализа [9, 10].

Для проверки качества лекарственных форм на основе боярышника используется спектрофотометрический метод количественного определения суммы флавоноидов в настойке в пересчете на рутин, а в сухом таблетированном экстракте количественно определяют суммарное содержание витексин-2-О-рамнозида и гиперозида методом ВЭЖХ [11, 12].

При этом использована хроматографическая колонка с неподвижной фазой С18, в качестве элюента смесь фосфорной кислоты : изопропилового спирта : тетрагидрофурана : воды (1 : 5 : 20 : 80; об.%) и аналитическая длина волны детектирования 340 нм. В литературе также описано определение флавоноидов методом ТСХ и ГЖХ. Необходимо отметить, что методика ВЭЖХ определения суммы флавоноидов в лекарственных формах на основе боярышника имеет ряд несомненных преимуществ перед другими методами по избирательности, чувствительности и экспрессности аналитических определений, однако при описанных в нормативных документах условиях хроматографирования не позволяет проводить раздельное определение флавоноидов и других компонентов лекарственной смеси. Представляет интерес одновременное определение содержания отдельных флавоноидов в лекарственном растительном сырье на основе боярышника и лекарственных форм на его основе, а также упрощение процедур пробы подготовки сырья и лекарственных форм [13, 14].

Исследования качественного и количественного определения витексина, рутина, гиперозида и кверцетина в сырье боярышника были проведены методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием [15].

В связи с этим целью нашей работы является изучение химического состава и биологической активности фенольных соединений листьев растения *Crataegus pontica* К.Koch. – боярышника понтийского, собранного в разные периоды вегетации. Сравнение состава растений, произрастающего на территории Республики Узбекистан, проводили методами двухмерной бумажной и ТСХ.

### Экспериментальная часть

**Объект исследования.** Объектом исследования служили листья боярышника (*Crataegus pontica*), собранные в начале октября 2019 г. и в конце апреля 2020 г. Место отбора и проб – Ташкентская область, Республика Узбекистан.

**Выделение полифенолов.** С целью выделения суммы полифенолов были использованы методы экстракции сырья с органическими растворителями. Нами осуществлена оптимизация данного метода. Для этого проведено изучение выхода суммы полифенолов от степени измельчения сырья, состава экстрагента, модуля экстракции, кратности экстракции, соотношения сырья-экстрагента, температуры экстракции, условий сгущения, обработки водного остатка органическими растворителями, условия осаждения суммы полифенолов и их высушивания. На основании полученных результатов разработана оптимальная методика выделения суммы полифенолов. Она заключается в следующем: воздушно-сухие измельченные (до размера 2–4 мм) листья *Crataegus pontica* (150 г) предварительно экстрагируют хлороформом для удаления липофильных веществ. Для этого сырье помещали в колбу емкостью 3 л, снабженную обратным холодильником, и экстрагировали хлороформом на водяной бане в соотношениях от 1 : 4 до 1 : 12 (сырье : хлороформ), при температуре от 20 °С до 75 °С в течение 2 ч, от однократной до пятикратной экстракции сырья. После обработки сырья хлороформом экстракцию продолжили водным ацетоном при концентрациях от 30 до 90%. Экстракцию повторяли от одного до пяти раз. Далее полученные водно-ацетоновые экстракты упаривали под вакуумом на роторном испарителе до остатка водной части. Очищенные водные извлечения обрабатывали этилацетатом на делительной воронке в соотношениях от 1 : 1 до 1 : 6 (водный остаток : этилацетат). Этилацетатные фракции сгущали и осаждали гексаном в соотношениях от 1 : 1 до 1 : 5 (концентрат : осадитель), выпадал хлопьевидный осадок.

Для экстракции растительного сырья использовали растворители ЗАО «Himreaktivkomplekt» (Узбекистан), все остальные реактивы производства Реахим (Россия). УФ-спектры полифенолов сняли в спиртовом растворе на приборе EPS-3T фирмы «Hitachi» (Япония), ИК-спектры сняли на приборе «IRTracer-100» (Shimadzu, Япония) в области 400–3800 см<sup>-1</sup>.

Разделение полифенолов проводили методом колоночной хроматографии на полиамиде и силикагеле марки LS 100/40 (Чехословакия). Для идентификации и определения однородности веществ применяли методы БХ (бумагу для хроматографии марки «Filtrak») и ТСХ (на пластинках Silufol UV – 254 (элюент: бензол – ацетон 9 : 4)).

Для разделения и изучения состава полифенолов использовали следующие системы растворителей:

- 1) *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (40 : 12 : 28);
- 2) 2% уксусная кислота;
- 3) *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4 : 1 : 5);
- 4) диэтиловый эфир – этилацетат (7 : 3);
- 5) диэтиловый эфир – этилацетат (4 : 6);

В качестве проявителей для опрыскивания хроматограмм использовали следующие реактивы:

- 1) 1% раствор ванилина в концентрированной соляной кислоте;
- 2) 1% водный и спиртовый растворы FeCl<sub>3</sub>;
- 3) смесь 1% водных растворов FeCl<sub>3</sub> и K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>];
- 4) катехиновый реактив (1%-ный раствор пикриновой кислоты в 95% этаноле и 5% раствор КОН в 80% этаноле);

**Изучение антиоксидантных свойств полифенолов на модели набухания митохондрий.** Некоторые полифенолы, проявляя антирадикальные свойства, преодолевают окисление липидов и белков в биологических мембранах. С целью выявления антиоксидантных свойств полифенолов боярышника было изучено действие различных концентраций суммы полифенолов растения *Crataegus pontica* индуцируемой системой Fe<sup>2+</sup>/аскорбат ПОЛ митохондрий. Митохондрии выделяли из печени крыс, массой 180–200 г, методом дифференциального центрифугирования по Шнейдеру. Животное декапитировали, извлекали печень и помещали его в стакан с ледяной средой выделения, содержащей 250 мМ сахарозы, 10 мМ *трис*-хлорида, 1 мМ ЭДТА, pH 7.4. Для освобождения сахарозы из митохондрий ресуспендировали с буферным раствором калия хлорида (175 мМ KCl, 25 мМ *трис*-хлорид, pH 7.4) и опять центрифугировали [16]. Потом изучали процесс перекисного окисления липидов мембран митохондрий в системе Fe<sup>2+</sup>/аскорбата. Изучали ПОЛ в

среде инкубации:  $\text{KCl} - 125 \text{ мМ}$ ,  $\text{трис-НСl} - 10 \text{ мМ}$ ,  $\text{pH} 7.4$ ; в среду инкубации добавляли  $20 \text{ мкМ FeSO}_4$  и  $600 \text{ мкМ}$  аскорбата; конечная концентрация митохондрий белка составляла  $0.5 \text{ мг/мл}$ . Активация ПОЛ нарушает функции мембран митохондрий, этот процесс регистрировали фотометрическим методом. Содержание белка митохондрий определяли по методу биурета [17] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

### Обсуждение результатов

Процесс выделения полифенолов из растительного сырья включает в себя ряд стадий: экстракцию сырья, обработку экстракции органическими растворителями, выпарку, осаждение суммы полифенолов, очистку и т.д. Повышение эффективности использования сырья достигается в основном на первой стадии – экстракции.

Проведено изучение выхода суммы полифенолов в зависимости от состава экстрагента, модуля экстракции, кратности экстракции, соотношения сырья – экстрагента, температуры экстракции, условий сгущения, обработки водного остатка органическими растворителями, условия осаждения суммы полифенолов и их высушивания [18]. Для определения оптимального модуля экстракции сырья – экстрагента были взяты в соотношениях  $1 : 4$ ,  $1 : 6$ ,  $1 : 8$ ,  $1 : 10$ ,  $1 : 12$ . По выходу экстрактивных веществ, вычисленных в процентах, судили об эффективности экстракции. Полученные результаты приведены на рисунке 1.

Из приведенных данных следует, что оптимальным соотношением сырье : экстрагент является соотношение  $1 : 10$ . Среднее значение выхода экстрактивных веществ составило  $41.0\%$ . При более низком модуле экстракции ( $1 : 4$ ;  $1 : 6$ ;  $1 : 8$ ) выход экстрактивных веществ неполный, а использование соотношения  $1 : 12$  приводит к увеличению объема экстракции, что в свою очередь приводит к перерасходу органических растворителей.

Подобным же образом нами проведено исследования оптимальной кратности экстракции. При этом применялись  $1, 2, 3, 4, 5$ -кратные методы экстракции. Полученные результаты приведены на рисунке 2.

Об эффективности экстракции судили по выходу экстрактивных веществ. Как следует из приведенных данных, наиболее оптимальной является  $3$ -кратная экстракция. Среднее значение выхода экстрактивных веществ составило  $44.0\%$ . При малой кратности экстракции ( $1, 2$ -кратная) выход экстрактивных веществ неполный, а при увеличении кратности ( $4, 5$ -кратная) экстракции выход экстрактивных веществ изменяется незначительно. При этом процесс экстракции занимает много времени и увеличивается объем экстракта, что также приводит в дальнейшем к увеличению расхода органических растворителей.

Для определения оптимального состава экстрагента нами использовался водный раствор ацетона разной концентрации. В качестве экстрагента применяли  $30, 40, 50, 60, 70, 80, 90\%$  водный ацетон. Полученные результаты приведены на рисунке 3.

Приведенные данные свидетельствуют, что наиболее оптимальным в качестве экстрагента является  $70\%$ -ный водный ацетон. При этом среднее значение выхода экстрактивных веществ составило  $46.0\%$ . Использование же водного ацетона с низкой концентрацией приводит к неполному извлечению экстрактивных веществ из сырья, а применение более высокой концентрации ацетона не приводит к увеличению выхода экстрактивных веществ.

Подобным же образом нами проведен поиск оптимальной температуры экстракции. При этом экстракцию вели в следующих температурных режимах:  $20-25, 30-35, 40-45, 50-55, 60-65, 70-75 \text{ }^\circ\text{C}$ . Полученные данные приведены на рисунке 4.

Из приведенных данных следует, что наиболее оптимальной температурой экстракции является  $40-45 \text{ }^\circ\text{C}$ , при таком режиме среднее значение экстрактивных веществ составило  $39.0\%$ . При более низких температурах выход экстрактивных веществ неполный, а при увеличении температуры экстракции до  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  и выше полифенольные вещества гидролизуются, что подтверждается данными бумажной хроматографии.

Подобным же образом исследована зависимость выхода экстрактивных веществ от времени экстракции, которую варьировали от  $1$  до  $3$  ч. Выявлено, что наиболее оптимальной является  $2$ -часовая экстракция.

Полученные экстракты концентрировали под вакуумом до водного остатка. Извлечение полифенолов из водного остатка проводили этилацетатом в соотношениях  $1 : 1$ ;  $1 : 2$ ;  $1 : 3$ ;  $1 : 4$ ;  $1 : 5$ ;  $1 : 6$ . Этилацетатные вытяжки объединяли, высушивали над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали. Полученные результаты приведены на рисунке 5.

Из приведенных данных следует, что оптимальное соотношение водного остатка с этилацетатом равно  $1 : 5$ . При низких соотношениях водного остатка и растворителя происходит неполное извлечение

полифенолов из водного остатка. Выход полифенолов незначительно увеличивается при соотношении 1 : 6, но при этом увеличивается расход растворителя.

Для осаждения полифенолов из этилацетатного концентрата использовали гексан. Соотношение концентрата с осадителем было 1 : 1; 1 : 2; 1 : 3; 1 : 4; 1 : 5. Полученные данные приведены на рисунке 6.

Из приведенных данных следует, что оптимальным соотношением концентрата и осадителя является 1 : 4. Средний выход суммы полифенолов при этом составил 4,28%. При соотношении 1 : 5 выход полифенолов увеличивается незначительно, но существенно увеличивается расход осадителя. При низком соотношении этилацетатного концентрата с осадителем происходит неполное осаждение полифенолов. Полнота осаждения полифенолов определяется появлением мути или осадка при дополнительном добавлении гексана к маточнику.



Рис. 1. Зависимость выхода экстрактивных веществ от модуля экстракции



Рис. 2. Зависимость выхода экстрактивных веществ от кратности экстракции

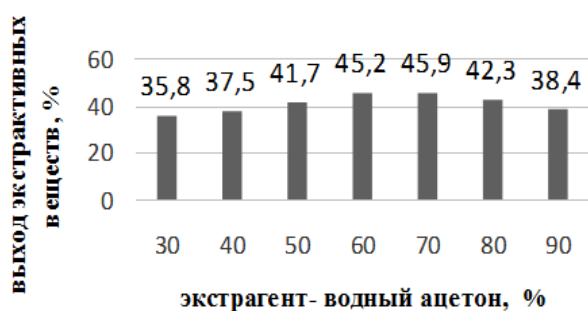


Рис. 3. Зависимость выхода экстрактивных веществ от состава экстрагента

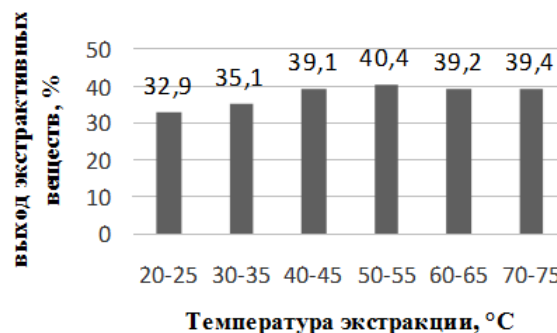


Рис. 4. Зависимость выхода экстрактивных веществ от температуры экстракции



Рис. 5. Подбор оптимального соотношения водного остатка с этилацетатом



Рис. 6. Зависимость полноты осаждения полифенолов от соотношения концентрата с осадителем

На основании полученных результатов разработана оптимальная методика выделения суммы полифенолов. Измельченное до 2–4 мм сырье высушивали под навесом. Высушенное сырье обрабатывали хлороформом для удаления смолистых веществ, пигментов и других сопутствующих примесей. Обработанный таким образом материал высушивали под воздушной тягой для удаления остатков растворителя и высушенный материал трехкратно экстрагировали 70%-ным ацетоном в соотношении 1 : 10. Полученные экстракты объединяли, концентрировали под вакуумом до небольшого объема и оставшийся водный остаток дополнительно обрабатывали хлороформом, затем многократно – этилацетатом (водный остаток : этилацетат – 1 : 5).

Объединенные этилацетатные вытяжки высушили над свежeproкаленным безводным сернокислым натрием и концентрировали под вакуумом в токе азота при 40–45 °С [19, 20]. Из концентрированного этилацетатного экстракта (1.5 л) полифенолы осаждали прибавлением четырехкратного количества гексана. Выпавший хлопьевидный осадок отфильтровали на стеклянном фильтре, перерастворили в абсолютном этиловом спирте, концентрировали и переосадили. Осадок отфильтровали через воронку Шотта, высушили в вакуумно-сушильном шкафу, выход суммы полифенолов составил 4.28% из весенних листьев.

Вышеуказанным методом также было получена сумма полифенолов из осенних листьев боярышника с выходом 2.6%.

Полученная таким образом сумма полифенолов из этилацетатной фракции листьев боярышника представляет собой аморфный порошок светло-коричневого цвета, вяжущего вкуса. С хлорным железом сумма дает синюю окраску (проявители 2 и 3), с 1%-ным раствором ванилина в концентрированной соляной кислоте – ярко-красную (проявитель 1).

При хроматографическом изучении выделенных фракций было установлено, что полифенолы этилацетатной фракции представлены в основном мономерными катехинами с небольшой примесью.

Двумерная хроматография на бумаге в системах растворителей 1 и 2 показала, что в составе суммы полифенолов этилацетатной фракции содержатся катехины, а именно (+)-катехин, (-)-эпикатехин.

5 г препарата суммы полифенолов из этилацетатной фракции многократно растирали в ступке с влажным диэтиловым эфиром (общий объем – 1000 мл). При этом в эфир переходят только мономерные катехины, полностью освобожденные от продуктов конденсации, проверенные бумажной хроматографией. Эфирный раствор хроматографировали на колонке (4.5×70 см) с силикагелем (100 г), используя в качестве элюента свободный от перекисей водонасыщенный диэтиловый эфир (система 4, 5). Контроль за разделением проводили с помощью бумажной хроматографии в системе 1. В результате в индивидуальном состоянии выделены флаван-3-олы. Выделенные флаван-3-олы идентифицированы как, (+)-катехин, (-)-эпикатехин.

**(+)-катехин** – 5,7,3',4'-тетрагидроксифлаван-3-ол. Мол. масса 290, т.пл. 172–173 °С,  $R_f$  0.64 (система 1),  $\lambda_{max}$  = 280 (в этаноле),  $[\alpha]_D$ -16.9° (этанол, с 1.05).

**(-)-эпикатехин** – (5,7,3',4'-тетрагидроксифлаван-3-ол), Мол. масса 290, т.пл. 235 °С,  $R_f$  0.56 и 0.30 (системы 1 и 2),  $\lambda_{max}$  = 276 нм (в этаноле),  $[\alpha]_D$ -60° (ацетон-вода 1 : 1, с 1.22).

Остальные соединения разделили на полиамидной колонке с использованием в качестве элюента смеси водо-этанола в различных соотношениях и выделили 4 соединения. С помощью физико-химических методов установлены структуры этих соединений.

**Вещество 1** – белые кристаллы из воды, т.пл. 221–223 °С,  $R_f$  0.51 в системе 1 (*n*-бутанол-уксусная кислота-вода 4 : 1 : 5 – верхняя фаза). Идентифицировано с галловой кислотой.

**Вещество 2** (элюировано 30% этанолом):  $C_{21}H_{30}O_{16}$ , т. пл. 190–192 °С (из  $CH_3OH$ ),  $R_f$  0.45 в системе 2 (*n*-бутанол-уксусная кислота-вода 4 : 1 : 2). УФ-спектр ( $C_2H_5OH$ ,  $\lambda_{max}$ , нм) 256, 264, 355 нм. При жестком кислотном гидролизе 10%  $H_2SO_4$  образуются кверцетин и рутиноза (т. пл. 187–188 °С). При кислотном гидролизе 1%  $H_2SO_4$  (ступенчатый гидролиз) образуются кверцетин (т. пл. 312–313 °С), D-глюкоза, L-рамноза, что было подтверждено тонкослойной хроматографией с достоверными образцами свидетелей. Идентифицирован как рутин (кверцетин-3-рутинозид).

**Вещество 3** (элюировано 55% этанолом):  $C_{21}H_{20}O_{12}$ , т. пл. 232–234 °С (из  $CH_3OH$ ),  $R_f$  0.35 (система 2). УФ-спектр ( $C_2H_5OH$ ,  $\lambda_{max}$ , нм) 361, 257, 265. При кислотном гидролизе вещества (1%  $H_2SO_4$ ) образуются кверцетин (т. пл. 312–313 °С) и D-галактоза. Сравнивая полученные данные с литературными, вещество идентифицировали как гиперозид.

**Вещество 4** (элюировано 80% этанолом):  $C_{15}H_{10}O_7$ , т. пл. 310–312 °С (из  $CH_3OH$ ), УФ-спектр ( $C_2H_5OH$ ,  $\lambda_{max}$  нм) 372, 264, 256.  $R_f$  0.64 (система 2). ИК-спектр (KBr,  $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ) 3380, 3300(OH), 1665(>C=O), 1615, 1565,

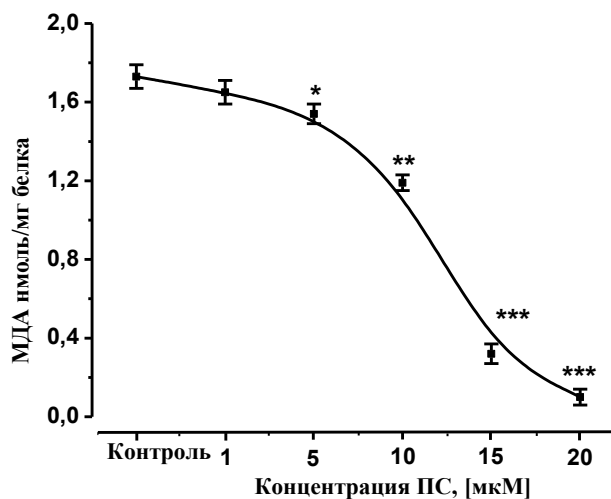
1515 (Ar), 815, 840 (*n*-замещение в кольце «В»). При щелочном плавлении образуются флороглюцин, протокатеховая кислота. Вещество идентифицировали как 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавонон (кверцетин).

Изучение антиоксидантной активности полифенолов. Антиоксиданты, эффективно влияя на функциональные параметры клеток и митохондрий, повышают активность ферментов супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, ингибируют перекисное окисление липидов (ПОЛ).

В экспериментах показатели максимальной скорости набухания митохондрий, вызванного после внесения в инкубационную среду  $Fe^{2+}$ /аскорбата, инициирующих ПОЛ, принимали за 100%. При этом продукты ПОЛ нарушают барьерную функцию митохондриальных мембран, что приводит к резкому набуханию митохондрий (рис. 7). В этих условиях внесение в инкубационную среду полифенолов в концентрации 5 мкМ приводит к усилению набухания митохондрий на  $16 \pm 1.2\%$  по сравнению с контролем, что свидетельствует об активации процесса ПОЛ в мембранах. Эти данные указывают на то, что полифенолы при низких концентрациях проявляют прооксидантные свойства. Однако более высокие концентрации проявляли антиоксидантные свойства. Так, при концентрациях 10, 20 и 30 мкМ ингибировал ПОЛ на  $9 \pm 0.8$ ,  $63.9 \pm 4.9$  и  $86 \pm 7.4\%$  по сравнению с контролем соответственно (рис. 7). При этом эффект полифенолов зависел от их концентраций: максимальное ингибирование набухания митохондрий отмечалось при концентрации, равной 40 мкМ. Значение концентрации полифенола, вызывающей полумаксимальное ингибирование процесса ПОЛ ( $IC_{50}$ ), составило 17.8 мкМ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что более низкие концентрации (5 мкМ) влияют на мембрану митохондрий как прооксидант, а более высокие – как антиоксидант. В литературе имеются данные о том, что фенольные соединения могут проявлять как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства.

Внесение в инкубационную среду  $Fe^{2+}$ /аскорбат индуцирует ПОЛ, в результате нарушаются функции мембран митохондрий, и они резко набухают по сравнению с контролем. В условиях индукции ПОЛ системой  $Fe^{2+}$ /аскорбат внесение в инкубационную среду рутин с концентрацией 5 мкМ ингибируются процессы ПОЛ на 32.0%, а при концентрации 10 мкМ – на 85.9% и в 20 мкМ – на 96.8% по сравнению с контролем [21].

Рис. 7. Действие полифенолов боярышника на накопление МДА в мембранах митохондрий печени крыс в условиях индукции ПОЛ (контроль –  $Fe^{2+}$ /аскорбат; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ;  $n=5$ )



### Выводы

Сравнительное исследование показало, что количественный и качественный состав *Crataegus pontica* (боярышник понтийский) зависит от времени или периода сбора.

Физико-химическими методами исследования были идентифицированы полифенолы, выделенные из *Crataegus pontica*.

Изучена антиоксидантная активность суммы полифенольных соединений при перекисном окислении липидов в митохондриях печени крыс и показано, что полифенолы оказывают протекторное действие на митохондрии, уменьшая повреждающее действие  $Fe^{2+}$ /аскорбат.

**Список литературы**

1. Каликинская Е. Антиоксиданты – защита от старения и болезней // Наука и жизнь. 2000. №8. С. 90–95.
2. Попков В.М., Чеснокова Н.П., Моррисон В.В. Активация липопероксидации – ведущий патогенетический фактор развития типовых патологических процессов и заболеваний различной этиологии. М., 2012. 450 с.
3. Национальное информационное агентство Узбекистан. Боярышник полезный дар природы. [Электронный ресурс]. URL: <http://uza.uz/ru/society/boyaryshnik-poleznuu-dar-prirody-19-10-2017>.
4. Куркин В.А., Морозова Т.Я., Правдивцева О.Е., Жавкина Т.М., Розно С.А. Содержание суммы флавоноидов в плодах и побегах некоторых видов рода Боярышника // Сборник научных трудов ГНБС. 2018. Т. 146. С. 172–174.
5. Соколов С.Я. Фитотерапия и фитофармакология. М., 2000. 976 с.
6. Теплова В.В., Исакова Е.П., Кляйн О.И., Дергачева Д.И., Гесслер Н.Н., Дерябина Ю.И. Природные полифенолы: биологическая активность, фармакологический потенциал, пути метаболической инженерии // Прикладная биохимия и микробиология. 2018. №3. С. 215–235.
7. НД 42-10888-00. Препарат Настойка боярышника.
8. НД 42-10428-99. Препарат Боярышник в лекарственной форме таблетки для рассасывания.
9. Куркина А.В. Определение содержания суммы флавоноидов в плодах Боярышника // Химико-фармацевтический журнал. 2014. №12. С. 27–30.
10. Романова Н.Г., Зеленков В.Н., Лапин А.А. Определение антиоксидантной активности плодово-ягодного сырья // Химические основы рационального использования возобновляемых природных ресурсов. 2010. Т. 22. №11. С. 71–74.
11. Салахов И.А., Гармонов С.Ю. Определение флавоноидов боярышника в лекарственных формах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Прикладная химия и химическая технология. 2007. №6. С. 22.
12. Коренман И.М. Методы определения органических соединений. М., 1970. 343 с.
13. Муравьева Д.А. Фармакогнозия. М., 1991. 465 с.
14. Полюдек-Фабини Р., Бейрих Т. Органический анализ. Л., 1981. 624 с.
15. Комилов Э.Ж., Эргашев Н.А., Ташбекова М.Х., Эшбакова К.А., Комилов Б.Ж., Асраров М. Изучение антиоксидантных свойств флавоноидов пуликарина и цинарозида на модели митохондрий // Вестник Гулистанского госуниверситета. 2016. №2. С. 32–43.
16. Gornall A.G., Bardawill C.J. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction // American journal of Cancer Prevention. 2013. Vol. 1. N2. Pp. 14–19.
17. Абдулладжанова Н.Г., Пирниязов А.Ж., Мавлянов С.М., Далимов Д.Н. Оптимизация выделения полифенолов из растительного сырья // Конференция молодых ученых, посвященная памяти акад. С.Ю. Юнусова. Ташкент, 2003. С. 49.
18. Mavlyanov S.M., Islambekov S.Y., Ismailov A.I., Dalimov D.N., Abdulladzhanova N.G. Vegetable tanning agents // Chem. Nat. Comp. 2001. Vol. 37 (1). Pp. 1–24.
19. Потапович А.И., Костюк В.А. Сравнительное исследование антиоксидантных свойств и цитопротекторной активности флавоноидов // Биохимия. 2003. Т. 68. №5. С. 632–638.
20. Уткина Е.А. Зависимость антиоксидантной активности флавоноидов от физико-химических характеристик в различных системах: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2005. 25 с.
21. Schneider W.C., Hageboom G.H. Cutochemical studies of mammalian tissues: The isolation of cell components by differential centrifugation // Cancer Research. 1951. Vol. 11(4). Pp. 1–22.

*Поступила в редакцию 12 июня 2020 г.*

*После переработки 26 февраля 2021 г.*

*Принята к публикации 12 марта 2021 г.*

**Для цитирования:** Раимова К.В., Абдулладжанова Н.Г., Тошпулатов Ф.Н., Эргашев Н.А., Матчанов А.Д. Изучение флавоноидного состава и биологической активности листьев боярышника понтийского *Crataegus pontica* // Химия растительного сырья. 2021. №3. С. 201–209. DOI: 10.14258/jcrpm.2021038023.



Raimova K.V.\*, Abdulladzhanova N.G., Toshpulatov F.N., Ergashev N.A., Matchanov A.D. STUDY OF THE FLAVONOID COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF HAWTHORN'S LEAVES *CRATAEGUS PONTICA*

Institute of Bioorganic Chemistry. acad. A.S. Sadykov, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, ul. Mirzo Ulugbek, 83, Tashkent, 100125 (Republic of Uzbekistan), e-mail: k.raimova\_81@mail.ru

The results of studies of the content of polyphenolic compounds and their antioxidant activity in the Pontic hawthorn plant *Crataegus pontica* K.Koch., growing in the mountainous regions of the Tashkent region of the Republic of Uzbekistan are presented. The collection of raw materials took place in the spring at the beginning of October 2019 and at the end of April 2020. The conditions for the isolation of polyphenolic compounds were selected under various conditions. It was shown that the optimal content of polyphenols is extracted with 70% acetone, followed by fractionation of the aqueous residue with ethyl acetate and precipitation with hexane. It was shown that in the plants harvested in spring, the amount of polyphenols was 4.28%, and the collected volume was 2.6%, of the air-dry mass of the raw material. Chromatographic methods (BC and TLC) revealed that the composition of plant leaves collected in spring contains more polyphenols than those collected in autumn. This plant contains compounds belonging to the class of flavonols, phenolic acids and flavan-3-ols. Polyphenols were identified by rutin, quercetin, quercetin-3-O- $\beta$ -galactoside, catechin, and gallic acid by BC and TLC methods.

The antioxidant activity of the sum of polyphenolic compounds was studied in the model of lipid peroxidation (LPO) in rat liver mitochondria. It was found that polyphenols have a protective effect on mitochondria, a reduced damaging effect of Fe<sup>2+</sup> / ascorbate and antioxidant activity depends on the concentration of the studied polyphenolic substances. The introduction of rutin into the incubation medium in 5  $\mu$ M medium inhibits LPO processes by 32.0%, and at 10  $\mu$ M – by 85.9% and in 20  $\mu$ M – by 96.8%, compared with the control.

**Keywords:** polyphenols, extraction, *Crataegus pontica*, lipid peroxidation, antioxidant activity.

### References

1. Kalikinskaya Ye. *Nauka i zhizn'*, 2000, no. 8, pp. 90–95. (in Russ.).
2. Popkov V.M., Chesnokova N.P., Morrison V.V. *Aktivatsiya lipoperoksidatsii – vedushchiy patogeneticheskiy faktor razvitiya tipovykh patologicheskikh protsessov i zabolevaniy razlichnoy etiologii*. [Activation of lipid peroxidation is a leading pathogenetic factor in the development of typical pathological processes and diseases of various etiologies]. Moscow, 2012, 450 p. (in Russ.).
3. *Natsional'noye informatsionnoye agentstvo Uzbekistan. Boyaryshnik poleznyy dar prirody*. [National News Agency Uzbekistan. Hawthorn is a useful gift of nature]. URL: <http://uza.uz/ru/society/boyaryshnik-poleznyy-dar-prirody-19-10-2017>. (in Russ.).
4. Kurkin V.A., Morozova T.Ya., Pravdivtseva O.Ye., Zhavkina T.M., Rozno S.A. *Sbornik nauchnykh trudov GNBS*, 2018, vol. 146, pp. 172–174. (in Russ.).
5. Sokolov S.Ya. *Fitoterapiya i fitofarmakologiya*. [Phytotherapy and phytopharmacology]. Moscow, 2000, 976 p. (in Russ.).
6. Teplova V.V., Isakova Ye.P., Klyayn O.I., Dergacheva D.I., Gessler N.N., Deryabina Yu.I. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2018, no. 3, pp. 215–235. (in Russ.).
7. ND 42-10888-00. *Preparat Nastoyka boyaryshnika*. [ND 42-10888-00. The drug is Tincture of hawthorn.]. (in Russ.).
8. ND 42-10428-99. *Preparat Boyaryshnik v lekarstvennoy forme tabletki dlya rassasyvaniya*. [ND 42-10428-99. The drug Hawthorn in the dosage form of a tablet for resorption]. (in Russ.).
9. Kurkina A.V. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 2014, no. 12, pp. 27–30. (in Russ.).
10. Romanova N.G., Zelenkov V.N., Lapin A.A. *Khimicheskiye osnovy ratsional'nogo ispol'zovaniya vozobnovlyayemykh prirodnykh resursov*, 2010, vol. 22, no. 11, pp. 71–74. (in Russ.).
11. Salakhov I.A., Garmonov S.Yu. *Prikladnaya khimiya i khimicheskaya tekhnologiya*, 2007, no. 6, p. 22. (in Russ.).
12. Korenman I.M. *Metody opredeleniya organicheskikh soyedineniy*. [Methods for the determination of organic compounds]. Moscow, 1970, 343 p. (in Russ.).
13. Murav'yeva D.A. *Farmakognosiya*. [Pharmacognosy]. Moscow, 1991, 465 p. (in Russ.).
14. Polyudek-Fabini P., Beyrikh T. *Organicheskiy analiz*. [Organic analysis]. Leningrad, 1981, 624 p. (in Russ.).
15. Komilov E.Zh., Ergashev N.A., Tashbekova M.Kh., Eshbakova K.A., Komilov B.Zh., Asrarov M. *Vestnik Gulistanskogo Gosuniversiteta*, 2016, no. 2, pp. 32–43. (in Russ.).
16. Gornall A.G., Bardawill C.J. *American journal of Cancer Prevention*, 2013, vol. 1, no. 2, pp. 14–19.
17. Abdulladzhanova N.G., Pirniyazov A.Zh, Mavlyanov S.M., Dalimov D.N. *Konferentsiya molodykh uchenykh, posvyashchennaya pamyati akad. S.Yu. Yunusova*. [Conference of young scientists dedicated to the memory of Academician S.Yu. Yunusov]. Tashkent, 2003, p. 49. (in Russ.).
18. Mavlyanov S.M., Islambekov S.Y., Ismailov A.I., Dalimov D.N., Abdulladzhanova N.G. *Chem. Nat. Comp.*, 2001, vol. 37 (1), pp. 1–24.
19. Potapovich A.I., Kostyuk V.A. *Biokhimiya*, 2003, vol. 68, no. 5, pp. 632–638. (in Russ.).
20. Utkina Ye.A. *Zavisimost' antioksidantnoy aktivnosti flavonoidov ot fiziko-khimicheskikh kharakteristik v razlichnykh sistemakh: avtoref. dis. ... kand. med. nauk*. [The dependence of the antioxidant activity of flavonoids on the physico-chemical characteristics in various systems: abstract of dis. ... Cand. medical sciences]. Moscow, 2005, 25 p. (in Russ.).
21. Schneider W.C., Hageboom G.H. *Cancer Research*, 1951, vol. 11(4), pp. 1–22.

Received June 12, 2020

Revised February 26, 2021

Accepted March 12, 2021

**For citing:** Raimova K.V., Abdulladzhanova N.G., Toshpulatov F.N., Ergashev N.A., Matchanov A.D. *Khimiya Ras-titel'nogo Syr'ya*, 2021, no. 3, pp. 201–209. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2021038023.

\* Corresponding author.

