

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОЦИАНИДИНОВ В ПОБЕГАХ БОЯРЫШНИКА ПЕРИСТОНАДРЕЗАННОГО (*CRATAEGUS PINNATIFIDA BUNGE*) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАНА БОКСА-БЕНКЕНА

© Мечикова Г.Я., Матющенко Н.В., Слободенюк Е.В.

Дальневосточный государственный медицинский университет (ДВГМУ)
Россия, 680000, Хабаровский край, г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, д. 35

Побеги боярышника перистонадрезанного – перспективное ценное растительное сырье дальневосточных фитоценозов, заслуживающее внимания отечественной медицины. Одним из классов биологически активных веществ, обеспечивающих фармакотерапевтическую активность данного сырья, являются процианидины.

Цель – разработка методики количественного определения суммы процианидинов в побегах боярышника перистонадрезанного с привлечением методологии поверхностного отклика и плана Бокса-Бенкена.

Материалы и методы. Побеги боярышника перистонадрезанного заготавливали в 2024 году в фазу начала цветения в естественной природной популяции на территории Хабаровского края. Для количественного определения процианидинов использовали модифицированный метод Porter, основанный на кислотном гидролизе олигомерных процианидинов до антоцианидинов в присутствии катализатора Fe³⁺. Работу выполняли на спектрофотометре UV-1700, Shimadzu (Япония). Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ГФ XV издания ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» с помощью пакетов прикладных компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 6.0.

Результаты. При разработке методики были оптимизированы условия экстракции процианидинов из побегов боярышника перистонадрезанного с помощью методологии поверхностного отклика и плана Бокса-Бенкена. Установлено, что максимальный выход процианидинов достигается при следующей комбинации параметров: экстрагент – спирт этиловый 54%; соотношение массы сырья к объему экстрагента – 1:116, время экстракции – 45 мин. Режим однократной экстракции является достаточным для выхода растворимой фракции процианидинов.

Заключение. Разработана методика количественного спектрофотометрического определения суммы процианидинов в побегах боярышника перистонадрезанного, которая будет использована для решения ряда вопросов, связанных со стандартизацией данного вида сырья.

Ключевые слова: боярышник перистонадрезанный; процианидины; количественный анализ; спектрофотометрия; стандартизация; план Бокса-Бенкена.

Мечикова Галина Ярославовна – канд. фарм. наук, доцент кафедры фармации и фармакологии, ДВГМУ, г. Хабаровск. ORCID iD: 0000-0001-7136-0626. E-mail: galina.m.ya@mail.ru (автор, ответственный за переписку).

Матющенко Наталья Владимировна – канд. фарм. наук, доцент кафедры фармации и фармакологии, ДВГМУ, г. Хабаровск. ORCID iD: 0009-0002-7424-0173. E-mail: k_fgbot@mail.fesmu.ru

Слободенюк Елена Владимировна – д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой фармации и фармакологии, ДВГМУ, г. Хабаровск. ORCID iD: 0000-0002-7740-3559. E-mail: helena-slobodenuk@yandex.ru

Процианидины – природные вещества растительного происхождения из класса полифенолов. Процианидины являются одной из наиболее распространенных групп полифенолов в рационе человека, поскольку присутствуют во многих пищевых и лекарственных растительных источниках [1-3]. Структурно процианидины являются олигомерами или полимерами флаван-3-олов и состоят исключительно из мономеров катехина и (-)-эпикатехина. В зависимости от стереоконфигурации и связи между мономерами димерные процианидины делят на А-тип и В-тип (рис. 1). Процианидины В-типа характеризуются одинарной межфлавановой связью между мономерами: C4→C8 или C4→C6. Процианидины А-типа содержат кроме межфлавановой связи дополнительную эфирную связь C2→O→C7 [4-6].

Процианидины и их мономеры не относятся к незаменимым веществам для человека, поскольку их отсутствие не вызывает состояния

дефицита. Тем не менее накопленные данные о значимых биологических эффектах этой группы полифенолов все больше привлекают внимание исследователей в области медицины. За счет большого количества гидроксильных групп эти вторичные метаболиты растений обладают высокой антиоксидантной и поглощающей радикалы активностью [7-10]. Значительный ряд исследований *in vivo* и *in vitro* демонстрирует сосудорасширяющие, кардиопротективные, противовоспалительные, иммуномодулирующие, противоаллергические возможности процианидиновых растительных комплексов; отдельные представители этой группы полифенолов ингибируют агрегацию тромбоцитов, гиперпроницаемость капилляров, окисление липопротеинов низкой плотности, а также обладают антибактериальным и противовирусным действием [2, 7-9, 11-14]. Показано, что процианидины играют потенциальную защитную роль при нейродегенеративных

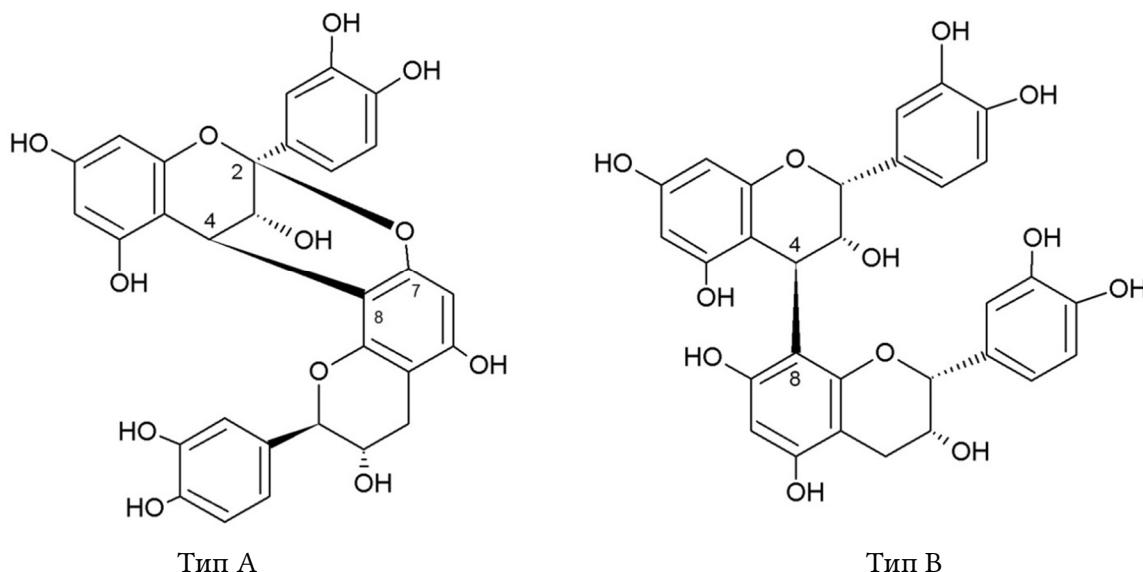


Рис. 1. Структурные формулы процианидинов.

Fig. 1. Structural formulas of procyanidins.

заболеваниях: снижают окислительный стресс, подавляют нейровоспаление и уменьшают агрегацию аномальных белков [15]. Процианидины оказывают защитное действие при некоторых онкологических эпизодах, в частности, выявлено несколько механизмов и молекулярных мишней, потенциально полезных для профилактики и лечения рака [8, 9, 16-19].

Как источники процианидинов интерес представляют виды рода Боярышник (*Crataegus L.*). Процианидины рассматриваются в литературе как наиболее важные активные антиоксиданты листьев, цветков и плодов различных видов боярышника, обеспечивающих их благотворное влияние, прежде всего, на сердечно-сосудистую систему [20-23].

С точки зрения ресурсного потенциала и биологической активности значительный интерес в перспективе дополнительного вида сырья для отечественной медицины заслуживает внимание Боярышник перистонадрезанный (*Crataegus pinnatifida Bunge*) – представитель фитоценозов Российского Дальнего Востока [24-26]. К сожалению, данный вид в Российской Федерации отсутствует в списке фармакопейных растений.

Для включения сырья боярышника перистонадрезанного в ранг официальных требуется провести ряд исследований, обеспечивающих научно обоснованный уровень стандартизации и разработать нормативную документацию.

Целью данного исследования явилась разработка методики количественного определения суммы процианидинов в побегах боярышника перистонадрезанного с привлечением методологии поверхностного отклика и плана Бокса-Бенкена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Побеги боярышника перистонадрезанного заготавливали в фазу начала цветения (начало июня) в 2024 году в естественной природной популяции Хабаровского края (с. Бычиха, Хабаровский район). Сушку сырья проводили воздушно-теневым способом в хорошо проветриваемом помещении.

Учитывая, что сырье является неоднородным – представляет собой верхушки ветвей с зелеными стеблями, листьями, цветками и бутонаами, сырье измельчали до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.

Для количественного определения процианидинов использовали модифицированный метод Porter, основанный на кислотном гидролизе олигомерных процианидинов до антоцианидинов в присутствии катализатора Fe^{3+} [27].

Для разработки методики точные навески измельченного сырья, соблюдая соотношения массы сырья к объему экстрагента 1:50 1:100 1:150 и 1:200, помещали в колбы со шлифом вместимостью 50 мл. Прибавляли по 50 мл спирта этилового определенной концентрации (40%, 50%, 60%, 70% и 80%), закрывали пробкой и взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбы присоединяли к системе обратных холодильников и нагревали на кипящей водяной бане в течение определенного в эксперименте времени (10, 20, 30 и 60 мин.). Затем колбы охлаждали до комнатной температуры и доводили до первоначальной массы спиртом этиловым соответствующей концентрации. Извлечение фильтровали через обеззоленный фильтр (красная лента), отбрасывали первые

10 мл фильтрата. По 0.1 мл полученных растворов помещали в термостойкие мерные колбы со шлифом вместимостью 10 мл, прибавляли по 8.0 мл кислого н-бутанола (смешивали 95 мл н-бутанола и 5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной) и по 0.20 мл 2% раствора квасцов железоаммониевых в 2М растворе хлористоводородной кислоты. Полученную смесь перемешивали, колбы закрывали пробкой и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры и доводили до метки кислым раствором н-бутанола, перемешивали. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 550 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения соответствующую исследуемую смесь без нагревания.

Содержание суммы процианидинов в абсолютно сухом сырье в процентах (С) вычисляли по формуле, используя удельный показатель поглощения [27].

$$C, \% = \frac{A \cdot 50 \cdot 10 \cdot 100}{A_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot a \cdot 0,1 \cdot (100 - W)}$$

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{1\text{ см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения при длине волны 550 нм продукта реакции, полученного в результате окислительного гидролиза процианидинов в кислом бутаноле в присутствии катализатора Fe³⁺, равный 345;

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

Для измерения оптической плотности использовали спектрофотометр UV-1700, Shimadzu (Япония). Каждый опыт в эксперименте повторяли трижды. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ГФ XV издания ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» с помощью пакетов прикладных компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительно в ходе разработки методики были установлены независимые факторы, объективно влияющие на эффективность экстракции процианидинов из побегов боярышника перистонадрезанного: концентрация спирта этилового (X_1), время экстракции (X_2) и соотношение массы сырья к объему экстрагента (X_3). Поэтому в задачу следующего этапа разработки методики входило определение значений независимых факторов, прежде всего их комбина-

цию, обеспечивающую максимальную экстракцию процианидинов из сырья. С этой целью использовали методологию поверхностного отклика и трехуровневый дизайн Бокса-Бенкена, представляющий собой математический метод анализа, который позволяет оценить взаимодействия независимых факторов технологического процесса и рассчитать их оптимальные значения с минимальным количеством экспериментальных испытаний [28].

Перед построением модели плана Бокса-Бенкена диапазон каждого независимого фактора экстракции определяли с помощью серии однофакторных экспериментов. В каждом эксперименте изменяли один фактор экстракции, при этом все остальные оставались постоянными. Варьирования концентрации спирта этилового, соотношения массы сырья к объему экстрагента, времени экстракции составляли 40%-80%, 1:50-1:200, 10-60 мин., соответственно. Результаты однофакторных экспериментов представлены на рисунке 2.

Однофакторный экспериментальный анализ показал, что наиболее высокий выход комплекса процианидинов из сырья достигается при использовании 50% спирта этилового, дальнейшее увеличение концентрации спирта не обеспечивало полноту извлечения (рис. 2А).

Оптимальным оказалось соотношение массы сырья к объему экстрагента 1:100, более высокое соотношение приводило, по-видимому, к растворению других веществ, что ухудшало растворимость целевых компонентов (рис. 2С). Положительная прямо пропорциональная зависимость выхода процианидинов наблюдалась с ростом продолжительности экстракции от 20 до 40 мин., далее содержание этой группы веществ в экстракте снижалось (рис. 2В).

Таким образом, на основании наблюдений, полученных в ходе проведения однофакторного экспериментального анализа, были определены диапазоны каждого независимого фактора и составлен план Бокса-Бенкена (3-факторный, 3-уровневый). В таблице 1 представлена матрица плана Бокса-Бенкена, состоящая из 15 точек, включая 3 центральных, кодированные и фактические значения уровней независимых факторов экстракции. Эффективность извлечения процианидинов оценивали по экспериментальному отклику ($Y_{\text{эксп.}}$) – количеству процианидинов в процентах в абсолютно сухом сырье боярышника перистонадрезанного.

Проведенные в соответствии с планом Бокса-Бенкена эксперименты (табл. 1) позволили установить взаимодействия между тремя независимыми факторами экстракции и экспериментальным откликом, которые описываются

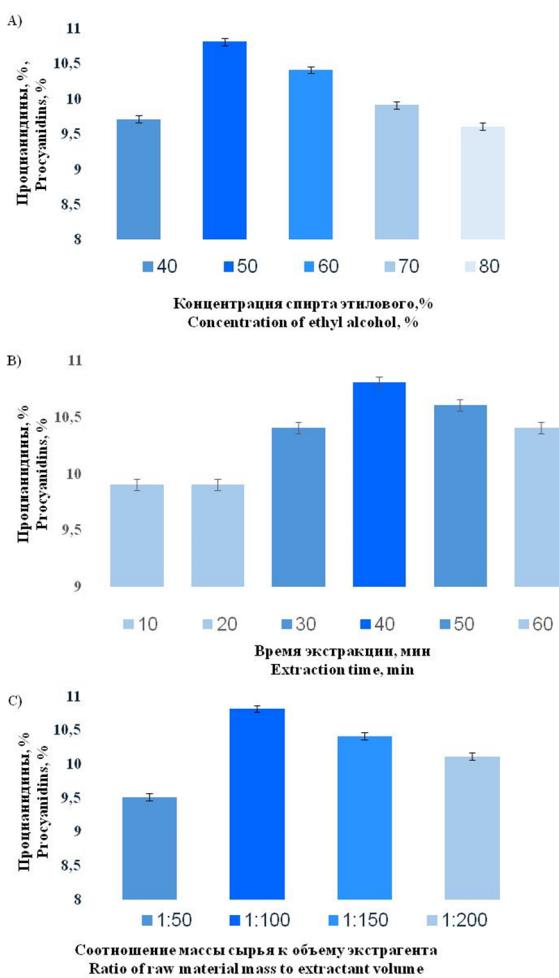


Рис. 2. Однофакторный экспериментальный анализ экстракции процианидинов из побегов боярышника перистонадрезанного: А – концентрация спирта этилового; В – время экстракции; С – соотношение массы сырья к объему экстрагента.

Fig. 2. One-factor experimental analysis of procyandins extracted from hawthorn shoots of *Crataegus pinnatifida*: A – ethyl alcohol concentration; B – extraction time; C – ratio of raw material weight to extractant volume.

следующим полиномиальным регрессионным уравнением второго порядка:

$$Y_{\text{расч}} = 10.82889 + 0.30804X_1 - 0.10262X_2 + 0.66292X_3 + 0.07808(X_1X_2) + 0.10083(X_1X_3) + 0.08000(X_2X_3) - 0.48057(X_1)^2 - 0.44140(X_2)^2 - 0.53249(X_3)^2,$$

где $Y_{\text{расч}}$ – рассчитанный отклик, связанный с комбинацией независимых факторов; 10.82889 – свободный член уравнения; X_n – регрессионные коэффициенты линейных факторных эффектов; X_{nm} – регрессионные коэффициенты эффектов взаимодействия; $(X_n)^2$ – регрессионные коэффициенты квадратичных факторных эффектов.

Используя уравнение, были рассчитаны прогнозируемые отклики ($Y_{\text{расч}}$) (табл. 1) и проведено их сравнение с экспериментальными ($Y_{\text{эксп}}$) (рис. 3). Высокий коэффициент корреляции ($R^2=0.97202$) указывает на согласованность экспериментального и расчетного отклика, что

определяет адекватность математической модели.

На рисунке 4 представлены поверхности отклика, которые были построены на основе полученного уравнения регрессии. Графические 3D модели поверхностей отклика отражают влияние исследуемых независимых факторов экстракции на выход процианидинов из побегов боярышника перистонадрезанного.

В соответствии с моделью наибольший выход процианидинов рассчитан на уровне 11.11% при следующих оптимизированных условиях: концентрация спирта этилового – 54%; время экстракции – 45 мин.; соотношение массы сырья к объему экстрагента – 1:116. Для подтверждения была проведена метрологическая оценка методики количественного определения процианидинов в побегах боярышника (табл. 2). Выход процианидинов в условиях эксперимента составил $11.02 \pm 0.08\%$, что вполне согласуется с расчетным значением. Также установлено, что

увеличение кратности экстракции не влияет на выход целевой группы веществ.

Таким образом, разработана методика количественного спектрофотометрического опреде-

ления суммы процианидинов в побегах боярышника перистонадрезанного, которая будет использована для решения ряда вопросов, связанных со стандартизацией данного вида сырья.

Таблица 1

Table 1

Конструкция плана Бокса-Бенкена и соответствующие значения откликов при экстракции процианидинов из побегов боярышника перистонадрезанного

Box-Behnken plan design and corresponding response values for the extraction of procyanidins from hawthorn pustule-adapted hawthorn shoots

№	Кодированные уровни факторов Coded factor levels			Фактические уровни факторов Actual factor levels			Отклик Response	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃	Y _{эксп., %} Y _{experimental, %}	Y _{расч. %} Y _{calculated, %}
1	+1	+1	0	60	60	1:100	10.23±0.08	10.19
2	+1	-1	0	60	30	1:100	10.44±0.06	10.24
3	-1	+1	0	40	60	1:100	9.22±0.08	9.42
4	-1	-1	0	40	30	1:100	9.74±0.05	9.78
5	0	0	0	50	45	1:100	10.82±0.04	10.83
6	+1	0	+1	60	45	1:125	10.71±0.18	10.89
7	+1	0	-1	60	45	1:75	9.29±0.03	9.36
8	-1	0	+1	40	45	1:125	10.14±0.05	10.07
9	-1	0	-1	40	45	1:75	9.12±0.11	8.95
10	0	0	0	50	45	1:100	10.85±0.05	10.83
11	0	+1	+1	50	60	1:125	10.63±0.05	10.50
12	0	+1	-1	50	60	1:75	9.04±0.15	9.01
13	0	-1	+1	50	30	1:125	10.51±0.07	10.54
14	0	-1	-1	50	30	1:75	9.24±0.10	9.27
15	0	0	0	50	45	1:100	10.82±0.06	10.83

Примечание: X₁ – концентрация спирта этилового; X₂ – время экстракции; X₃ – соотношение массы сырья к объему экстрагента.

Note: X₁ – ethyl alcohol concentration; X₂ – extraction time; X₃ – ratio of raw material weight to extractant volume.

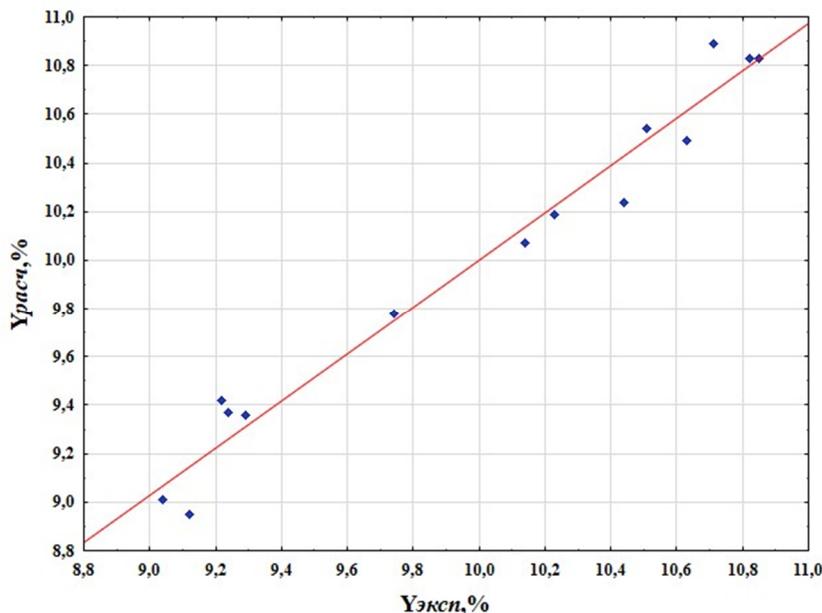


Рис. 3. Сравнение экспериментальных и модельных откликов экстракции процианидинов из побегов боярышника перистонадрезанного.

Fig. 3. Comparison of experimental and model responses to procyanidins extraction from shoots of *Crataegus pinnatifida*.

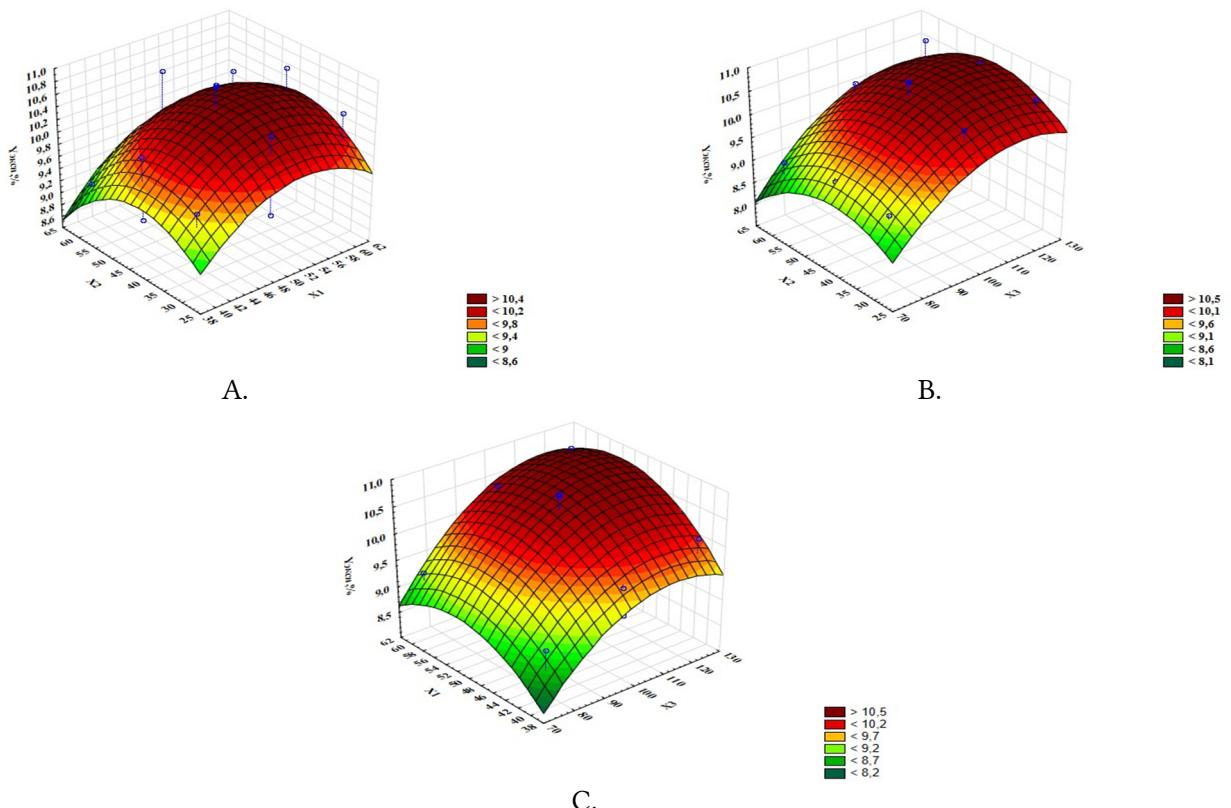


Рис. 4. Графики поверхности отклика, отражающие влияние условий экстракции на выход процианидинов из побегов боярышника перистонадрезанного: А – зависимость содержания процианидинов от концентрации спирта этилового и времени экстракции; В – зависимость содержания процианидинов от времени экстракции и массы сырья к объему экстрагента; С – зависимость содержания процианидинов от концентрации спирта этилового и массы сырья к объему экстрагента.

Fig. 4. Response surface graphs reflecting the effect of extraction conditions on the yield of procyanidins from the shoots of *Crataegus pinnatifida*: A – dependence of procyanidin content on ethyl alcohol concentration and extraction time; B – dependence of procyanidin content on extraction time and raw material mass to extractant volume; C – dependence of procyanidin content on ethyl alcohol concentration and raw material mass to extractant volume.

Таблица 2

Table 2

Условия спектрофотометрической методики количественного определения процианидинов в побегах боярышника перистонадрезанного

Conditions of spectrophotometric technique for the quantitative determination of procyanidins in shoots of hawthorn pistonadrass

Параметры методики Methodology parameters	Оптимизированные значения параметров методики Optimized values of parameters techniques	Метрологические характеристики Metrological characteristics
Измельченность сырья, мм Raw material size reduction, mm	1	
Соотношение массы сырья к объему экстрагента Ratio of raw material weight to extractant volume	1:116	$\bar{X}=11.02$
Концентрация спирта этилового, % Concentration of ethyl alcohol, %	54	$n = 6$
Время экстракции, мин Extraction time, min	45	$f = 5$
Кратность экстракции Extraction rate	1	$S = 0.0771$
Объем аликовты, мл Aliquot volume, ml	0.1	$RSD = 0.6996\%$
Время нагревания испытуемого раствора на кипящей водяной бане для проведения окислительного гидролиза, мин Time of heating the test solution on a boiling water bath for oxidative hydrolysis, min	60	$S_{\bar{x}} = 0.0315$ $P, \% = 95$ $t(P, f) = 2.57$ $\Delta \bar{X} = 0.0809$ $\bar{E} = 0.73\%$

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта в форме субсидий из краевого бюджета Хабаровского края (Соглашение № 83С/2024 от 26.06.2024 г.).

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРОВ

Мечикова Г.Я. – концепция и дизайн исследования, выполнение эксперимента, анализ и интерпретация полученных данных, написание статьи, утверждение рукописи для публикации; Матющенко Н.В. – статистический анализ, научное редактирование, техническое оформление; Слободенюк Е.В. – анализ и интерпретация полученных данных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hammerstone J.F., Lazarus S.A., Schmitz H.H. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr.* 2000;130(8):2086-2092. DOI: 10.1093/jn/130.8.2086S.
2. Valencia-Hernandez L.J., Wong-Paz J.E., Ascacio-Valdés J.A., Chávez-González M.L., Contreras-Esquivel J.C., Aguilar C.N. Procyanidins: from agro-industrial waste to food as bioactive molecules. *Foods* 2021;10(12):3152. DOI: 10.3390/foods10123152.
3. Zeng Y., Zhao L., Wang K., Renard C.M.G.C., Bourvellec C.L., Hu Z., Liu X. A-type proanthocyanidins: sources, structure, bioactivity, processing, nutrition, and potential applications *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2024;23(3):e13352. DOI: 10.1111/1541-4337.13352.
4. Rue E.A., Glinski J.A., Glinski V.B., van Breemen R.B. Ion mobility-mass spectrometry for the separation and analysis of procyanidins. *J Mass Spectrom.* 2020;55(2):e4377. DOI: 10.1002/jms.4377.
5. Rue E.A., Rush M.D., Breemen R.B. Procyanidins: a comprehensive review encompassing structure elucidation via mass spectrometry. *Phytochem Rev.* 2018;17(1):1-16. DOI: 10.1007/s11101-017-9507-3.
6. Nie F., Liu L., Cui J., Zhao Y., Zhang D., Zhou D., Wu J., Li B., et al. Oligomeric proanthocyanidins: an updated review of their natural sources, synthesis, and potentials. *Antioxidants.* 2023;12(5):1004. DOI: 10.3390/antiox12051004.
7. Alverina C., Ferni, Wirjatmadi B. Procyanidin and its benefits on aging: a literature review. *IJMSCRS.* 2022;2(8):762-769. DOI: 10.47191/ijmscrs/v2-i8-09.
8. Chen H., Wang W., Yu S., Wang H., Tian Z., Zhu S. Procyanidins and their therapeutic potential against oral diseases. *Molecules.* 2022;27(9):2932. DOI: 10.3390/molecules27092932.
9. Dasiman R., Nor N.M., Eshak Z., Mutalip S.S.M., Suwandi N.R., Bidin H. A review of procyanidin: updates on current bioactivities and potential health benefits. *Biointerface Research in Applied Chemistry.* 2022;12(5):5918-5940. DOI: 10.33263/BRIAC125.59185940.
10. Li S., Xu M., Niu Q., Xu S., Ding Y., Yan Y., Guo S., Li F. Efficacy of procyanidins against in vivo cellular oxidative damage: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139455. DOI: 10.1371/journal.pone.0139455.
11. Osakabe N., Fushimi T., Fujii Y. Hormetic response to B-type procyanidin ingestion involves stress-related neuromodulation via the gut-brain axis: preclinical and clinical observations. *Front Nutr.* 2022;9:969823. DOI: 10.3389/fnut.2022.969823.
12. Ferni Alverina C., Mas'ud A. F. A systematic review of procyanidins: updates on current bioactivities and potential benefits in wound healing. *IJMSCRS.* 2022;2(8):718-723. DOI: 10.47191/ijmscrs/v2-i8-01.
13. Tian Y., Yang C., Yao Q., Qian L., Liu J., Xie X., Ma W., Nie X., et al. Procyanidin B2 activates PPAR γ to induce M2 polarization in mouse macrophages. *Front Immunol.* 2019;10:1895. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01895.
14. Qaed E., Almoiliqy M., Al-Hamyari B., Qaid A., Alademy H., Al-Maamari A., Alyafeai E., Geng Z., et al. Procyanidins: a promising anti-diabetic agent with potential benefits on glucose metabolism and diabetes complications. *Wound Rep Reg.* 2023;31(5):688-699. DOI: 10.1111/wrr.13115.
15. Ruan W., Shen S., Xu Y., Ran N., Zhang H. Mechanistic insights into procyanidins as therapies for Alzheimer's disease: a review. *JFF.* 2021;86:104683. DOI: 10.1016/j.jff.2021.104683.
16. Lee Y. Cancer Chemopreventive Potential of Procyanidin. *Toxicol Res.* 2017;33(4):273-282. DOI: 10.5487/TR.2017.33.4.273.
17. Lei Y., Deng X., Zhang Z., Chen J. Natural product procyanidin B1 as an antitumor drug for effective therapy of colon cancer. *Exp Ther Med.* 2023;26(5):506. DOI: 10.3892/etm.2023.12205.
18. Mao J.T., Lu Q.-Y., Xue B., Neis P., Zamora F.D., Lundmark L., Qualls C., Massie L. A pilot study of a grape seed procyanidin extract for lung cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila).* 2019;12(8):557-566. DOI: 10.1158/1940-6207.
19. Xue B., Lu Q.-Y., Massie L., Qualls C., Mao J.T. Grape seed procyanidin extract against lung cancer: the role of microRNA-106b, bioavailability, and bioactivity. *Oncotarget.* 2018;9(21):15579-15590. DOI: 10.18632/oncotarget.24528.
20. Hellenbrand N., Sendker J., Lechtenberg M., Petereit F., Hensel A. Isolation and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins in leaves and flowers of Hawthorn (*Crataegus* spp.). *Fitoterapia.* 2015;104:14-22. DOI: 10.1016/j.fitote.2015.04.010.
21. Sendker J., Petereit F., Lautenschläger M., Hellenbrand N., Hensel A. Phenylpropanoid-substituted procyanidins and tentatively identified procyanidin glycosides from Hawthorn (*Crataegus* spp.). *Planta Med.* 2013;79(1):45-51. DOI: 10.1055/s-0032-1327926.
22. Svedstroem U., Vuorela H., Kostainen R., Tuominen J., Kokkonen J., Rauha J.P., Laakso I., Hiltunen R. Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. *Phytochemistry.* 2002;60(8):821-825.
23. Kumar D., Arya V., Bhat Z.A., Khan N.A., Prasad D.N. The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives. *Rev Bras Farmacogn.* 2012;22(5):1187-1200. DOI: 10.1590/S0102-695X2012005000094.

24. Черепанов С.К. *Сосудистые растения России и со-пределенных государств (в пределах бывшего СССР)*. Санкт-Петербург: Мир и семья, 1995. 992 с. [Cherepanov S.K. *Vascular plants of Russia and neighbouring states (within the former USSR)*. Saint Petersburg: Mir i sem'ya, 1995. 992 p. (in Russ.)]. END: ZBKYNV.
25. Han X., Zhou Q., Gao Z., Xu G.B., Chen H., Chitrakar B., Sun Y., Zhao W., et al. Characterization of procyanidin extracts from hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) in human colorectal adenocarcinoma cell line Caco-2, simulated digestion, and fermentation identified unique and novel prebiotic properties. *Food Res Int.* 2023;165:112393. DOI: 10.1016/J.FOODRES.2022.112393.
26. Li R., Luan F., Zhao Y., Wu M., Lu Y., Tao C., Zhu L., Zhang C., et al. *Crataegus pinnatifida*: A botanical, ethnopharmacological, phytochemical, and pharmacological overview. *J Ethnopharmacol.* 2023;301(16): 115819. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115819.
27. Porter L.J., Hrstich L.N., Chan B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*. 1986;25(1):223-230. DOI: 10.1016/s0031-9422(00)94533-3.
28. Ferreira S.L.C., Bruns R.E., Ferreira H.S., Matos G.D., David J.M., Brandão G.C., Da Silva G.C.P., Portugal L.A., et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*. 2007;597(2):179-186. DOI: 10.1016/J.ACA.2007.07.011.

Поступила в редакцию 14.12.2024

Подписана в печать 25.10.2025

Для цитирования: Мечикова Г.Я., Матющенко Н.В., Слободенюк Е.В. Разработка методики количественного определения процианидинов в побегах боярышника перистонадрезанного (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) с использованием плана Бокса-Бенкена. *Человек и его здоровье*. 2025;28(3):85–93. DOI: 10.21626/vestnik/2025-3/11. EDN: ZSTBRA.

DEVELOPMENT OF A TECHNIQUE FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF PROCYANIDINS IN SHOOTS OF *CRATAEGUS PINNATIFIDA* BUNGE USING THE BOX-BEHNKEN PLAN

© Mechikova G.Ya., Matyushchenko N.V., Slobodenyuk E.V.

Far Eastern State Medical University (FESMU)

35, Muravyov-Amursky Str., Khabarovsk, Khabarovsk region, 680000, Russian Federation

The shoots of the hawthorn are a promising raw material of the Far Eastern phytocenoses, deserving the attention of domestic medicine. One of the classes of biologically active substances that ensure the pharmacotherapeutic activity of the plant are procyanidins.

Objective – development of a methodology for quantitative determination of the sum of procyanidins in shoots of hawthorn pistonadrass using the surface response methodology and the Box-Behnken plan.

Materials and methods. The shoots of the hawthorn were harvested in 2024 during the beginning phase of flowering in the natural population in Khabarovsk Territory. For quantitative determination of procyanidins, we used a modified Porter method based on acid hydrolysis of oligomeric procyanidins to anthocyanidins in the presence of a Fe^{3+} catalyst. The tests were performed on a UV-1700 spectrophotometer, Shimadzu (Japan). Statistical processing of the results was carried out in accordance with the GF XV edition of the OFS.1.1.0013 "Statistical processing of the results of physical, physico-chemical and chemical tests" using Microsoft Office Excel 2010 and Statistica 6.0 software packages.

Results. During the development of the technique, the conditions for the extraction of procyanidins from the shoots of hawthorn were optimized using the surface response methodology and the Box-Benken plan. It has been established that the maximum yield of procyanidins is achieved with the following combination of parameters: the extractant is ethyl alcohol 54%; the ratio of the mass of the raw material to the volume of the extractant is 1:116, the duration of extraction is 45 minutes. The single extraction mode is sufficient to yield a soluble fraction of procyanidins.

Conclusion. A technique has been developed for the quantitative spectrophotometric determination sum of procyanidins in the shoots of hawthorn, which will be used in solving a number of issues related to the standardization of *Crataegus pinnatifida*.

Keywords: *Crataegus pinnatifida* BUNGE; procyanidins; quantitative analysis; spectrophotometry; standardization; Box-Behnken plans.

Mechikova Galina Ya. – Cand. Sci. (Pharm), Associate Professor at the Department of Pharmacy and Pharmacology, FESMU, Khabarovsk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-7136-0626. E-mail: galina.m.ya@mail.ru

Matyushchenko Natalia V. – Cand. Sci. (Pharm), Associate Professor at the Department of Pharmacy and Pharmacology, FESMU, Khabarovsk, Russian Federation. ORCID iD: 0009-0002-7424-0173. E-mail: k_fgbot@mail.fesmu.ru

Slobodenyuk Elena V. – Dr. Sci. (Biol), Professor, Head of the Department of Pharmacy and Pharmacology, FESMU, Khabarovsk, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-7740-3559. E-mail: helena-slobodenuk@yandex.ru

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The work was carried out with the financial support of a grant in the form of subsidies from the regional budget of the Khabarovsk Territory (Agreement No. 83C/2024 dated 06.26.2024).

AUTHORS CONTRIBUTION

Mechikova G.Ya. – concept and design of the study, experiment execution, analysis and interpretation of the data obtained, writing an article, approving the manuscript for publication; Matyushchenko N.V. – statistical analysis, scientific editing, technical design; Slobodenyuk E.V. – analysis and interpretation of the data obtained.

Received 14.12.2024

Accepted 25.10.2025

For citation: Mechikova G.Ya., Matyushchenko N.V., Slobodenyuk E.V. Development of a technique for quantitative determination of procyanidins in shoots of *Crataegus pinnatifida* BUNGE using the Box-Behnken plan. *Humans and their health*. 2025;28(3):85–93. DOI: 10.21626/vestnik/2025-3/11. EDN: ZSTBRA.