

УДК 615.322/615.072

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТОЦИАНОВ В ЛИСТЬЯХ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

© Н.А. Ковалева*, О.В. Тринеева, И.В. Чувикова

Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1,
Воронеж, 394018, Россия, natali-sewer@yandex.ru

Расширение сырьевой базы – одно из направлений современного этапа развития фармакогнозии. Поиск новых перспективных источников БАВ, в т.ч. среди морфологических групп официального сырья, не подвергающихся в настоящий момент заготовке в промышленных масштабах, будет способствовать в дальнейшем разработке и внедрению новых отечественных лекарственных растительных препаратов. Листья облепихи крушиновидной богаты различными БАВ (дубильные вещества, аминокислоты и органические кислоты, каротиноиды, витамины группы В, аскорбиновая кислота, флавоноиды и др.). Согласно литературным данным, листья редко содержат антоцианы, но это не исключает присутствие лейкоантоцианов, которые способны окрашивать «кислые» извлечения при длительной экстракции в красно-вишневый цвет, вследствие превращения при таких условиях экстракции в, собственно, антоциановые соединения. На основании вышеизложенного целью исследования являлась разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения антоцианов в листьях облепихи крушиновидной. Объект исследования – высушенные листья облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) (влажность не более 10%) различных фенологических фаз жизни растения, произрастающего на территории Воронежской области, (I (начало июня) – фаза завязывания плодов, II (середина июля) – фаза начала созревания плодов, III (конец августа – начало сентября) – фаза массового плодоношения). Установлено, что содержание антоцианов в сырье колеблется от 1.8 до 2.3% в зависимости от фенологической фазы жизни растения. Проведена валидация разработанной методики по показателям: прецизионность (на этапе повторяемости), предел обнаружения, предел количественного обнаружения, линейность, область линейности. Согласно полученным результатам, методика валидна и пригодна для оценки качества листьев облепихи крушиновидной. Так как ранняя заготовка листьев может повлиять на качество фармакопейного сырья (плоды), рекомендуемая фаза к заготовке – фаза массового плодоношения (конец августа – начало сентября). Полученные результаты вносят вклад в расширение представлений о составе полифенольного комплекса БАВ данного доступного ежегодно возобновляемого растительного сырья.

Ключевые слова: листья облепихи крушиновидной, лейкоантоцианы, антоцианы, спектрофотометрия.

Для цитирования: Ковалева Н.А., Тринеева О.В., Чувикова И.В. Разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения антоцианов в листьях облепихи крушиновидной // Химия растительного сырья. 2025. №2. С. 130–138. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20250214889>.

Введение

Расширение сырьевой базы – одно из направлений современного этапа развития фармакогнозии. Поиск новых перспективных источников БАВ, в т.ч. среди морфологических групп официального сырья, не подвергающихся в настоящий момент заготовке в промышленных масштабах, будет способствовать в дальнейшем разработке и внедрению новых отечественных лекарственных растительных препаратов. Облепиха крушиновидной – широко распространенное растение, плоды которого являются фармакопейным сырьем [1]. В целях рационального использования природных ресурсов, переработке с целью выделения комплекса биологически активных веществ (БАВ) также можно подвергать и листья облепихи крушиновидной. В проведенных ранее исследованиях зарубежными и российскими учеными установлен разнообразный состав БАВ в листьях. Основными БАВ являются флавоноиды, дубильные вещества, витамины (С и Е), аминокислоты, органические кислоты, витамины группы В и др. [2–11]. Опубликовано также несколько патентов РФ и Китая, в которых листья, ветви и шрот облепихи служат источником

* Автор, с которым следует вести переписку.

получения фенольных соединений (флавоноиды, биофлавоноиды, дубильные вещества), оказывающих противовоспалительный и противовирусный эффекты [12–17]. На основе полифенольного комплекса листьев облепихи крушиновидной разработан противовирусный лекарственный препарат «Гипорамин» [18].

При обзоре литературных источников не выявлено упоминаний о таких соединениях, как антоцианы и лейкоантоцианы. При проведении серии скрининговых исследований на различные группы БАВ нами было отмечено, что при экстракции подкисленным спиртом этиловым наблюдается покраснение извлечения. Согласно литературным данным, листья редко содержат антоцианы, но это не исключает присутствие лейкоантоцианов [19, 20], которые способны окрашивать «кислые» извлечения при длительной экстракции в красно-вишневый цвет, вследствие превращения при таких условиях экстракции в, собственно, антоциановые соединения. На основании вышеизложенного целью исследования являлась разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения антоцианов в листьях облепихи крушиновидной.

Экспериментальная часть

Объект исследования – высушенные листья облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) (влажность не более 10%) различных фенологических фаз жизни растения, произрастающего на территории Воронежской области (I (начало июня) – фаза завязывания плодов, II (середина июля) – фаза начала созревания плодов, III (конец августа – начало сентября) – фаза массового плодоношения). В качестве экстрагента использовался спирт этиловый 96% подкисленный кислотой хлороводородной до концентрации 1% [21, 22]. При разработке спектрофотометрической методики количественного определения антоцианов в листьях облепихи крушиновидной варьировали такими параметрами, как степень измельчения сырья (0.2–3.0 мм), соотношение сырье : экстрагент (1 : 25, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 150, 1 : 200), время (30, 60, 90, 120, 150 и 180 мин.) и кратность экстракции (одно- и двухкратная). За основу была взята фармакопейная методика ФС.2.5.0002.15 «Аронии черноплодной свежие плоды» Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) XIV издания. Измерение оптической плотности полученного извлечения проводили на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», СПб, Россия). Валидация методики проведена в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик [23] ГФ РФ XIV издания. Статистическая обработка проведена с применением программного обеспечения Microsoft Excel.

Обсуждение результатов

Согласно фармакопейной методике количественного определения антоцианов в сырье [22, 23], экстрагентом является спирт этиловый 96%, подкисленный кислотой хлористоводородной. При снятии спектра поглощения получаемого извлечения в области длин волн от 200 до 800 нм наблюдался максимум поглощения при 535±2 нм. Согласно литературным данным, цианидин-3-О-глюкозид имеет максимум поглощения при 535±2 нм [23]. Следовательно, расчет содержания антоцианов в листьях облепихи крушиновидной следует вести в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, удельный показатель поглощения которого составляет 100 [23]. Вид спектра поглощения подкисленного спиртового извлечения из листьев облепихи крушиновидной представлен на рисунке 1.

На первом этапе разработки методики нами была подобрана оптимальная степень измельчения сырья в диапазоне от 3.0 до 0.2 мм при следующих параметрах получения извлечения (1 : 100, 30 мин, однократно). Полученные результаты представлены в таблице 1.

Максимальный выход антоцианов наблюдался при экстракции фракции сырья с размером частиц менее 1.0–0.5 мм (0.774%).

На следующем этапе варьировали таким параметром, как длительность экстракции при следующих параметрах получения извлечения (1 : 100, однократно, фракция сырья менее 1.0–0.5 мм). Минимальное время экстракции выбрано 30 мин и с последующим шагом 30 мин до достижения – 180 мин (3.0 ч). Полученные результаты представлены в таблице 2.

Исходя из таблицы 2, наблюдается постепенное увеличение выхода антоцианов из сырья с увеличением длительности экстракции, достигая максимума при 150 мин (2.5 ч), снижаясь к 180 мин (3.0 ч). Следовательно, оптимальным временем экстракции выбрано 150 мин, соответствующее максимальному количеству протеканию реакции окисления лейкоформ антоцианов в кислой среде в присутствии кислорода

воздуха. Дальнейшее снижение к 180 мин наблюдения обусловлен, по всей видимости, разрушением антоцианов при длительном воздействии высоких температур.

Следующий этап разработки – варьирование соотношением сырье : экстрагент при следующих параметрах получения извлечения (однократно, 150 мин, фракция сырья менее 1.0–0.5 мм). Полученные результаты представлены в таблице 3.

При увеличении соотношения возрастает выход антоцианов из сырья и достигает максимума при соотношении 1 : 150, что в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид составляет 2.188%.

На заключительном этапе по выбранным ранее оптимальным параметрам (табл. 1–3) варьировали кратностью экстракции (одно- и двухкратная). Двухкратную экстракцию навески ЛРС в 1.0 г осуществляли дважды порциями экстрагента по 75 мл по 75 мин, объединяя полученное извлечение. Результаты представлены на рисунке 2.

Исходя из полученных данных, увеличение кратности экстракции при сохранении общего времени процесса и объема получаемого экстракта не приводит к возрастанию выхода антоцианов в извлечение. Это объясняется сокращением времени контакта сырья с порцией экстрагента, а также снижением интенсивности процессов диффузии вследствие снижения градиента концентрации на разделе фаз сырье-экстрагент при снижении объема экстрагента.

По подобранным оптимальным условиям проведено количественное определение антоцианов в листьях облепихи крушиновидной трех фенологических фаз жизни растения. Результаты представлены в таблице 4.

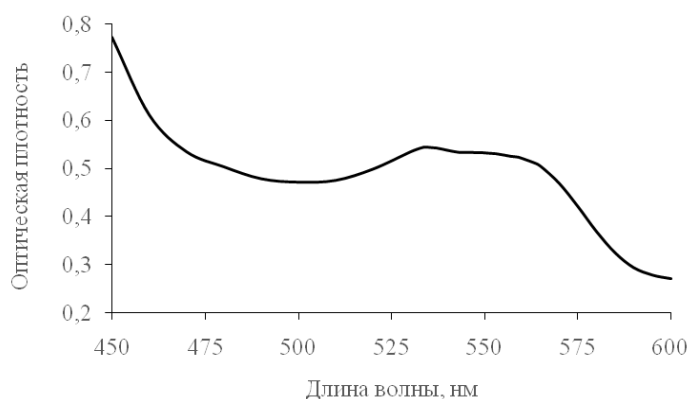


Рис. 1. Спектр поглощения извлечения из листьев облепихи крушиновидной (экстрагент – спирт этиловый 96% подкисленный) в видимой области спектра

Таблица 1. Влияние размера частиц на выход антоцианов из сырья

Степень измельчения, мм	Содержание антоцианов, в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, % а.с.с
менее 0.2	0.646±0.019
0.5–0.2	0.426±0.029
1.0–0.5	0.774±0.023
2.0–1.0	0.356±0.011
3.0–2.0	0.369±0.011

Таблица 2. Влияние длительности экстракции на выход антоцианов из сырья

Время экстракции, мин	Содержание антоцианов, в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, % а.с.с
30	0.774±0.023
60	1.011±0.030
90	1.108±0.033
120	1.267±0.037
150	1.483±0.044
180	1.416±0.042

Таблица 3. Влияние соотношения сырье : экстрагент на выход антоцианов из сырья

Соотношение сырье : экстрагент	Содержание антоцианов, в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, % а.с.с
1 : 25	0.710±0.021
1 : 50	1.309±0.039
1 : 100	1.483±0.044
1 : 150	2.188±0.065
1 : 200	1.578±0.047



Рис. 2. Влияние кратности экстракции на выход антоцианов из сырья

Таблица 4. Содержание антоцианов в листьях различных фенологических фазах заготовки

Фенологическая фаза	Содержание антоцианов, в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, % а.с.с
I	2.188±0.065
II	2.355±0.070
III	1.847±0.055

Согласно полученным результатам, наиболее богата антоцианами фенологическая фаза II. Следует отметить, что содержание антоцианов возрастает ко II фазе незначительно, по сравнению с I фазой, но резко снижается к III. Предположительно, это связано с разрушением лейкоантоциановых соединений под влиянием таких факторов, как температура и влажность воздуха, снижением количества осадков, а также активным плодоношением растения.

На заключительном этапе была проведена оценка стабильности оптической плотности во времени полученного извлечения из ЛРС. Результаты представлены на рисунке 3.

Исходя из графика, оптическая плотность извлечения стабильна только в течение первых 25 мин после разведения. При дальнейшем измерении наблюдается значительное увеличение оптической плотности, что может быть связано с образованием побочных продуктов, ассоциации полученных антоцианов по средствам водородных связей в извлечении, что сопровождается отклонением от закона Бугера-Ламберта-Бера.

Методика количественного определения антоцианов в листьях облепихи крушиновидной заключается в следующем:

Навеску сырья около 1.0 г (т.н.), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1.0 мм, помещают в колбу на 250 мл, заливают 150 мл подкисленного кислотой хлороформ-этилового спирта 96% до концентрации 1% и экстрагируют на кипящей водяной бане с обратным холодильником 150 мин при периодическом перемешивании. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые порции фильтрата, в мерные колбы вместимостью 100 и 50 мл, доводят до метки тем же растворителем. Содержимое колб объединяют в одном стакане, тщательно перемешивают (раствор А). 10 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки тем же растворителем (раствор Б). Измеряют оптическую плотность раствора Б не позднее 30 минут после разведения при длине волны 535 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно растворителя. Расчет содержания антоцианов в листьях, в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид, в абсолютно сухом сырье ведут по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot V_{k1} \cdot V_{k2} \cdot 100 \cdot 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot 100 \cdot a \cdot (100 - W) \cdot V_a \cdot l},$$

где A_x – оптическая плотность раствора Б; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения цианидин-3-О-глюкозида при длине волны 534 нм, равный 100; V_{k1} и V_{k2} – объем раствора А и объем раствора Б, соответственно, мл; a – навеска сырья, взятая на анализ, г; V_a – объем аликвоты раствора А, мл; W – влажность сырья, %; l – толщина слоя, см.

Спирт этиловый 96% подкисленный: в соответствии с ОФС «Реактивы» ГФ РФ XIV издания [21].

Результаты метрологической оценки методики представлены в таблице 5.

Разработанная методика подверглась валидации по следующим характеристикам: линейность, предел обнаружения, область линейности, предел количественного определения, прецизионность на этапе сходимости (повторяемость) [24].

Линейность проверялась на 8 уровнях концентрации (12.5–175%). Растворы готовили путем уменьшения и увеличения аликвоты исходного извлечения. Уравнение прямой, величина достоверности аппроксимации, наклон прямой и отрезок на оси ординат представлены на рисунке 4 и в таблице 6. На рисунке видно, что почти все точки лежат на одной прямой и, так как $R^2 > 0.99$, наблюдается линейная зависимость по всем выбранным аликвотам. Предел обнаружения антоцианов составляет 0.1704×10^{-3} г/мл. Область линейности наблюдается в широком диапазоне содержаний БАВ от 0.17×10^{-3} до 2.4×10^{-3} г/мл извлечения. Предел количественного определения составил 0.64×10^{-3} г/мл извлечения.

Повторяемость методики оценивалась на одном образце в 7 повторностях. Величина относительного стандартного отклонения составила 1.33%, так как значение не превышает 5%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (табл. 7).

Таблица 5. Метрологические характеристики методики определения суммы антоцианов в листьях облепихи крушиновидной ($P=95\%$; $n=7$)

\bar{x}	S^2	S	$S\bar{x}$	Δx	$\Delta \bar{x}$	ε , %	$\varepsilon_{\text{ср}}$, %
2.215	0.000872	0.0295	0.0111	0.0723	0.0272	3.264	1.228

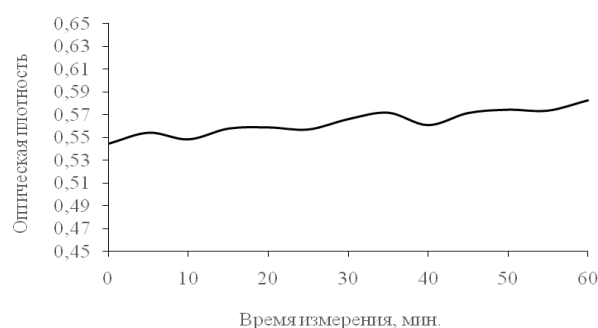


Рис. 3. Стабильность оптической плотности извлечения во времени

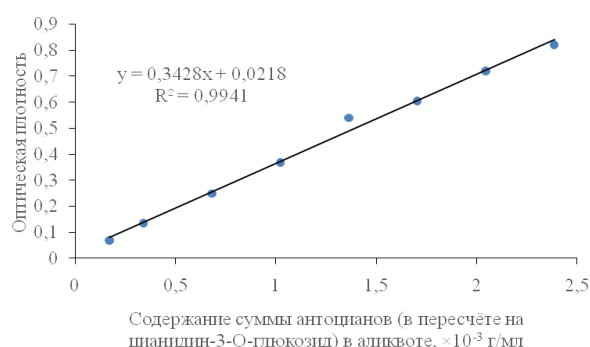


Рис. 4. Зависимость оптической плотности извлечения из листьев облепихи крушиновидной от содержания суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид ($\times 10^{-3}$ г/мл)

Таблица 6. Результаты исследования методики по показателю линейность

Аликвота извлечения, %	Аликвота извлечения, мл	Оптическая плотность раствора	Содержание суммы антоцианов в аликвоте, $\times 10^{-3}$ г/мл
12.5	1.25	0.0695	0.1704
25	2.5	0.1352	0.3408
50	5.0	0.2481	0.6817
75	7.5	0.3679	1.023
100	10.0	0.5395	1.363
125	12.5	0.6043	1.704
150	15.0	0.7194	2.045
175	17.5	0.8203	2.386
Коэффициент корреляции			0.9941

Таблица 7. Результаты определения прецизионности методики

Номер опыта	Содержание суммы антоцианов в сырье, %
1	2.199
2	2.212
3	2.182
4	2.231
5	2.193
6	2.214
7	2.271
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	1.33
Стандартное отклонение (SD)	2.95

Заключение

Таким образом, впервые для стандартизации листьев облепихи крушиновидной разработана методика количественного определения одного из компонентов фенольного комплекса БАВ – антоцианов методом спектрофотометрии. Установлено, что содержание антоцианов в сырье колеблется от 1.8 до 2.3% в зависимости от фенологической фазы жизни растения. Проведена валидация разработанной методики по показателям: прецизионность (на этапе повторяемости), предел обнаружения, предел количественного обнаружения, линейность, область линейности. Согласно полученным результатам, методика валидна и пригодна для оценки качества листьев облепихи крушиновидной. Так как ранняя заготовка листьев может повлиять на качество фармакопейного сырья (плоды), рекомендуемая фаза к заготовке – фаза массового плодоношения (конец августа – начало сентября). Рекомендуемая норма содержания данной группы БАВ в листьях облепихи крушиновидной – не менее 1.5%. Однако предлагаемый критерий качества сырья может быть установлен только при подобных исследованиях листьев, заготовленных в период плодоношения (в различных климатических зонах этот период может варьировать) от растений, произрастающих в различных регионах РФ. Полученные результаты вносят вклад в расширение представлений о составе полифенольного комплекса БАВ данного доступного ежегодно возобновляемого растительного сырья.

Финансирование

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Воронежского государственного университета. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. ФС.2.5.0121 Облепихи крушиновидной плоды. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М., 2023.
2. Ковалёва Н.А., Тринеева О.В., Чувинова И.В., Колотнева А.И., Носова Д.К. Определение некоторых биологически активных веществ в листьях облепихи крушиновидной титриметрическими методами // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2023. №2. С. 97–102.
3. Ковалёва Н.А., Тринеева О.В., Чувинова И.В., Сафонова Е.Ф. Исследование состава органических кислот в листьях облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) // Химия растительного сырья. 2023. №3. С. 211–219. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20230311849>.
4. Ковалёва Н.А., Тринеева О.В., Чувинова И.В., Сливкин А.И. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной методом спектрофотометрии // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2023. Т. 13, №2. С. 216–226. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-531>.
5. Suryakumar G., Gupta A. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) // J. Ethnopharmacol. 2011. Vol. 138(2). Pp. 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.024>.
6. Черняк Д.М., Титова М.С. Содержание каротина и витаминов Е и С в дальневосточных растениях // Тихоокеанский медицинский журнал. 2015. №2 (60). С. 92–93.
7. Criste A., Urcan A.C., Bunea A., Furtuna F.R.P., Olah N.K., Madden R.H., Corcionivoschi N. Phytochemical Composition and Biological Activity of Berries and Leaves from Four Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Varieties // Molecules. 2020. Vol. 25(5). 1170. <https://doi.org/10.3390/molecules25051170>.
8. Новрузов Э.Н., Мамедов З.Г., Мустафаева Л.А., Мирюсифова Х.М., Зейналова А.М. Состав и содержание флавоноидов листьев *Hippophae rhamnoides* L., произрастающих в Азербайджане // Химия растительного сырья. 2018. №3. С. 209–214. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018033772>.
9. Jaroszewska A., Biel W. Chemical composition and antioxidant activity of leaves of mycorrhized sea-buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) // Chilean Journal of Agricultural Research. 2017. Vol. 77. Pp. 155–162. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000200155>.

10. Pop R.M., Weesepeol Y., Socaciu C., Pintea A., Vincken J.P., Gruppen H. Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties // Food Chem. 2014. Vol. 147. Pp. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.083>.
11. Arimboor R., Kumar K.S., Arumughan C. Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD // J. Pharm. Biomed. Anal. 2008. Vol. 47(1). Pp. 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.11.045>.
12. Патент №2098111 (РФ). Способ получения противовирусного препарата «Гипорамин» / О.Н. Толкачев, О.П. Шейченко, И.И. Фадеева, В.И. Шейченко, Т.С. Семенова, Л.Д. Шипулина, С.А. Вичканова. – 1994.
13. Патент №2118163 (РФ). Лекарственное средство для лечения вирусных заболеваний / Л.Д. Шипулина, С.А. Вичканова, О.П. Шейченко, О.Н. Толкачев. – 1994.
14. Патент №2197978 (РФ). Способ получения противовирусного препарата Гипорамина (варианты) / О.П. Шейченко, О.Н. Толкачев, В.И. Шейченко, Л.Д. Шипулина, С.А. Вичканова, В.А. Быков. – 2001.
15. Патент №2711728 (РФ). Способ получения комплекса биофлавоноидов из обезжиренного облепихового шрота / Е.В. Аверьянова, М.Н. Школьников, А.В. Малахова, Е.Д. Рожнов. – 2022.
16. Patent 107595902 (CN). Extraction method of total flavonoids in branches and leaves of sea buckthorn / L. Zuo, D. Chen, X. Meng, Yu. Song, Ch. Yang. – 2017.
17. Patent 108272837 (CN). Method for extracting flavone compounds from sea-buckthorn leaves / Zh. Dong, F. Xi, Yo. Qiao, S. Zhao. – 2018.
18. VIDAL. Справочник лекарственных средств. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.vidal.ru/>.
19. Пугачева О.В., Тринеева О.В., Панова К.Е. Количественное определение антоцианов в листьях аронии Мичурина // Сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств». Воронеж, 2023. С. 356–359. <https://doi.org/10.17308/978-5-9273-3827-6-2023-356-359>.
20. Пугачева О.В., Тринеева О.В., Панова К.Е. Валидация методики количественного определения антоцианов в листьях аронии Мичурина // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2023. Т. 22, №4. С. 214–222. <https://doi.org/10.37903/vsgma.2023.4.29>.
21. ОФС.1.3.0001.15 Реактивы, индикаторы. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М., 2018. Т. 1.
22. ФС.2.5.0064.18 Василька синего цветки. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М., 2018. Т. 4.
23. ФС.2.5.0002.15 Аронии черноплодной свежие плоды. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М., 2018. Т. 4.
24. ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М., 2018. Т. 1.

Поступила в редакцию 19 марта 2024 г.

После переработки 25 ноября 2024 г.

Принята к публикации 5 декабря 2024 г.

Kovaleva N.A.*, Trineeva O.V., Chuvikova I.V. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTHOCYANINS IN SEA BUCKTHORN LEAVES

Voronezh State University, Universitetskaya pl., 1, Voronezh, 394018, Russia, natali-sewer@yandex.ru

Expanding the raw material base is one of the directions of the current stage of development of pharmacognosy. Search for new promising sources of biologically active substances, incl. among the morphological groups of official raw materials that are not currently being harvested on an industrial scale, will contribute to the further development and implementation of new domestic medicinal herbal preparations. Sea buckthorn leaves are rich in various biologically active substances (tannins, amino acids and organic acids, carotenoids, B vitamins, ascorbic acid, flavonoids, etc.). According to the literature, leaves rarely contain anthocyanins, but this does not exclude the presence of leucoanthocyanins, which can color «sour» extracts with a cherry-red color during long-term extraction, consequences of transformation under such conditions of extraction of anthocyanin compounds themselves. Based on the above, the purpose of the study was to develop and validate a spectrophotometric method for the quantitative determination of leucoanthocyanins in sea buckthorn leaves. The object of the study is the dried leaves of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) (humidity no more than 10%) of various phenological phases of the life of a plant growing in the Voronezh region (I (early June) – fruit set phase, II (mid-July) – phase the beginning of fruit ripening, III (late August-early September) – phase of mass fruiting). It has been established that the content of leucoanthocyanins in raw materials ranges from 1.8 to 2.3% depending on the phenological phase of the plant's life. The developed methodology was validated according to the following indicators: precision (at the repeatability stage), detection limit, quantitative detection limit, linearity, linearity range. According to the results obtained, the method is valid and suitable for assessing the quality of sea buckthorn leaves. Since early harvesting of leaves can affect the quality of pharmacopoeial raw materials (fruits), the recommended phase for harvesting is the phase of mass fruiting (late August-early September). The results obtained will be included in the draft pharmacopoeial articles for sea buckthorn leaves. The results obtained contribute to expanding the understanding of the composition of the polyphenolic complex of biologically active substances of this annually available renewable plant material.

Keywords: sea buckthorn leaves, leucoanthocyanins, anthocyanins, spectrophotometry.

For citing: Kovaleva N.A., Trineeva O.V., Chuvikova I.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2025, no. 2, pp. 130–138. (in Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.20250214889>.

References

1. FS.2.5.0121 *Oblepikhi krushinovidnoy plody. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XV izd.* [FS.2.5.0121 Sea buckthorn fruits. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XV ed.]. Moscow, 2023. (in Russ.).
2. Kovalova N.A., Trineeva O.V., Chuvikova I.V., Kolotneva A.I., Nosova D.K. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*, 2023, no. 2, pp. 97–102. (in Russ.).
3. Kovalova N.A., Trineeva O.V., Chuvikova I.V., Safonova Ye.F. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2023, no. 3, pp. 211–219. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20230311849>. (in Russ.).
4. Kovalova N.A., Trineeva O.V., Chuvikova I.V., Slivkin A.I. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya. Regulyatornyye issledovaniya i ekspertiza lekarstvennykh sredstv*, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 216–226. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-531>. (in Russ.).
5. Suryakumar G., Gupta A. *J. Ethnopharmacol.* 2011, vol. 138(2), pp. 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.024>.
6. Chernyak D.M., Titova M.S. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*, 2015, no. 2 (60), pp. 92–93. (in Russ.).
7. Criste A., Urcan A.C., Bunea A., Furtuna F.R.P., Olah N.K., Madden R.H., Corcionivoschi N. *Molecules*, 2020, vol. 25(5), 1170. <https://doi.org/10.3390/molecules25051170>.
8. Novruzov E.N., Mamedov Z.G., Mustafayeva L.A., Miryusifova Kh.M., Zeynalova A.M. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 3, pp. 209–214. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018033772>. (in Russ.).
9. Jaroszewska A., Biel W. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 2017, vol. 77, pp. 155–162. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000200155>.
10. Pop R.M., Weesepeol Y., Socaciu C., Pintea A., Vincken J.P., Gruppen H. *Food Chem.*, 2014, vol. 147, pp. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.083>.
11. Arimboor R., Kumar K.S., Arumugham C. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, vol. 47(1), pp. 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.11.045>.
12. Patent 2098111 (RU). 1994. (in Russ.).
13. Patent 2118163 (RU). 1994. (in Russ.).
14. Patent 2197978 (RU). 2001. (in Russ.).
15. Patent 2711728 (RU). 2022. (in Russ.).
16. Patent 107595902 (CH). 2017.
17. Patent 108272837 (CH). 2018.
18. VIDAL. *Spravochnik lekarstvennykh sredstv*. [VIDAL. Handbook of Medicines]. URL: <https://www.vidal.ru/>. (in Russ.).
19. Pugacheva O.V., Trineeva O.V., Panova K.Ye. *Sbornik trudov 9-oy Mezhdunarodnoy nauchno-metodicheskoy konferentsii «Puti i formy sovershenstvovaniya farmatsevticheskogo obrazovaniya. Aktual'nyye voprosy razrabotki i issledovaniya novykh lekarstvennykh sredstv»*. [Collection of works of the 9th International scientific and methodological

* Corresponding author.

- conference "Ways and forms of improving pharmaceutical education. Actual issues of development and research of new drugs"]. Voronezh, 2023, pp. 356–359. <https://doi.org/10.17308/978-5-9273-3827-6-2023-356-359>. (in Russ.).
20. Pugacheva O.V., Trineyeva O.V., Panova K.Ye. *Vestnik Smolenskoй gosudarstvennoy meditsinskoй akademii*, 2023, vol. 22, no. 4, pp. 214–222. <https://doi.org/10.37903/vsgma.2023.4.29>. (in Russ.).
21. *OFS.1.3.0001.15 Reaktivы, indikatorы. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoй Federatsii. XIV izd.* [OFS.1.3.0001.15 Reagents, indicators. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed.]. Moscow, 2018, vol. 1. (in Russ.).
22. *FS.2.5.0064.18 Vasil'ka sinego tsvetki. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoй Federatsii. XIV izd.* [FS.2.5.0064.18 Blue cornflower flowers. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed.]. Moscow, 2018, vol. 4. (in Russ.).
23. *FS.2.5.0002.15 Aronii chernoplodnoy svezhiye plody. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoй Federatsii. XIV izd.* [FS.2.5.0002.15 Fresh chokeberry fruits. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed.]. Moscow, 2018, vol. 4. (in Russ.).
24. *OFS.1.1.0012.15 Validatsiya analiticheskikh metodik. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoй Federatsii. XIV izd.* [OFS.1.1.0012.15 Validation of analytical methods. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed.]. Moscow, 2018, vol. 1. (in Russ.).

Received March 19, 2024

Revised November 25, 2024

Accepted December 5, 2024

Сведения об авторах

Ковалева Наталья Александровна – аспирант,
natali-sewer@yandex.ru

Тринева Ольга Валерьевна – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии, trineevaov@mail.ru

Чуви́кова Ирина Вячеславовна – ординатор,
ira.chuvikova.01@mail.ru

Information about authors

Kovaleva Natalia Aleksandrovna – postgraduate student,
natali-sewer@yandex.ru

Trineeva Olga Valerievna – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, trineevaov@mail.ru

Chuvikova Irina Vyacheslavovna – resident,
ira.chuvikova.01@mail.ru