



Н.А. Ковалёва ✉ 
О.В. Тринеева 
И.В. Чуви́кова 
А.И. Сливкин 

Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной методом спектрофотометрии

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет»,
Университетская пл., д. 1, г. Воронеж, 394018, Российская Федерация

✉ Ковалёва Наталья Александровна; natali-sewer@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Плоды облепихи крушиновидной — фармакопейное сырье для получения облепихового масла. Другие части растения (кора, листья, побеги) являются объектами исследований с целью расширения сырьевой базы и рационального использования ограниченных природных ресурсов. Листья облепихи крушиновидной богаты различными биологически активными соединениями, одними из которых являются флавоноиды.

Цель работы: разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях облепихи с использованием спектрофотометрии в видимой области спектра.

Материалы и методы: объектом исследования являлись высушенные листья облепихи крушиновидной трех фенологических фаз (I — фаза завязывания плодов, II — фаза единичного созревания плодов, III — фаза массового созревания плодов), заготовленные в 2022 г. от дикорастущих растений в Воронежской области. Для количественного определения флавоноидов в листьях облепихи была использована методика, основанная на измерении оптической плотности раствора, содержащего продукты взаимодействия флавоноидов с алюминия хлоридом.

Результаты: максимум поглощения комплекса спиртового извлечения из листьев облепихи крушиновидной с алюминия хлоридом наблюдался при 402 ± 2 нм, что соответствует максимуму поглощения лютеолина. Оптимальные параметры экстрагирования: экстрагент — спирт этиловый 70%; соотношение сырье : экстрагент — 1:150; степень измельчения — 0,5 мм; кратность экстракции — одна-кратная; время экстракции — 45 мин.

Выводы: разработана и валидирована методика количественного спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в листьях облепихи крушиновидной, которая может быть использована для стандартизации данного лекарственного растительного сырья (ЛРС). Установлено, что наибольшее содержание суммы флавоноидов (до 1,5%) характерно для сырья, заготовленного в фенологическую фазу I (середина июня). Содержание флавоноидов постепенно снижается к середине июля и концу августа. В связи с тем что облепиха крушиновидная является источником получения облепихового масла, а ранний сбор листьев может привести к снижению его ценности и несоответствию фармакопейным требованиям, предложено выбрать рекомендуемый срок заготовки листьев, совпадающий со сбором плодов, так как листья на данном этапе роста и развития еще содержат достаточное количество флавоноидов (до 0,8%) и могут быть использованы как самостоятельное ЛРС.

Ключевые слова: флавоноиды; листья облепихи крушиновидной; фенологические фазы; валидация

Для цитирования: Ковалёва Н.А., Тринеева О.В., Чуви́кова 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;13(2):216–226. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-531>

N.A. Kovaleva ✉ 
O.V. Trineeva 
I.V. Chuvikova 
A.I. Slivkin 

Development and Validation of a Procedure for Quantitative Determination of Flavonoids in Sea Buckthorn Leaves by Spectrophotometry

Voronezh State University,
1 Universitetskaya Sq., Voronezh 394018, Russian Federation

✉ **Natalia A. Kovaleva**; natali-sewer@yandex.ru

ABSTRACT

Sea buckthorn fruits are a pharmacopoeial raw material used to produce sea buckthorn oil. Other parts of the plant (bark, leaves, and shoots) are objects of research aiming to expand the raw material base and use limited natural resources rationally. Sea buckthorn leaves are rich in biologically active compounds, including flavonoids. **The aim of the study** was to develop and validate an analytical procedure for the quantification of flavonoids in sea buckthorn leaves using spectrophotometry in the visible spectral region.

Materials and methods. The study focused on dried leaves of sea buckthorn harvested in the Voronezh region in 2022. These leaves were collected from wild plants at three phenological stages: fruit setting (I), single fruit ripening (II), and mass fruit ripening (III). To quantify flavonoids in sea buckthorn leaves, the authors used an analytical procedure based on measuring the absorbance of a solution containing products of the reaction between flavonoids and aluminium chloride.

Results. The absorption maximum of the complex between the alcohol extract of sea buckthorn leaves and aluminium chloride was observed at 402 ± 2 nm; the wavelength corresponds to the absorption maximum of luteolin. The optimal extraction conditions included 70% ethanol as the extraction solvent, a raw material to solvent ratio of 1:150, a particle size of 0.5 mm, and a single extraction cycle of 45 min.

Conclusions. The authors developed and validated a spectrophotometric procedure for the quantification of total flavonoids, expressed as luteolin, in sea buckthorn leaves. The procedure can be used to standardise this herbal drug. As observed in the study, the total flavonoid content was the highest (up to 1.5%) in the raw material at phenological stage I (collected in mid-June) and gradually decreased through mid-July to the end of August. Since sea buckthorn is the source of sea buckthorn oil and the early collection of leaves may decrease its value or lead to non-compliance with pharmacopoeial requirements, the recommended time for harvesting leaves should coincide with that for harvesting fruits. Collected at this stage of growth and development, sea buckthorn leaves still contain sufficient flavonoids (up to 0.8%) and can be used as an individual herbal drug.

Key words: flavonoids; sea buckthorn leaves; phenological stages; validation

For citation: Kovaleva N.A., Trineeva O.V., Chuvikova I.V., Slivkin A.I. Development and validation of a procedure for quantitative determination of flavonoids in sea buckthorn leaves by spectrophotometry. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2):216–226. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-531>

Введение

Облепиха крушиновидная (*Hippophaë rhamnoides* L.) — многолетний ветроопыляемый двудомный ягодный кустарник. Плоды облепихи являются фармакопейным сырьем и служат источником для получения субстанции растительного происхождения — облепихового масла [1]. Другие части растения (листья, почки, побеги, кора) активно изучаются как российскими, так и зарубежными исследователями, но в медицине используются ограниченно. Благодаря богатому

химическому составу биологически активных веществ (БАВ), среди которых флавоноиды, дубильные вещества, витамины, органические, полиненасыщенные жирные кислоты и аминокислоты, листья облепихи являются перспективным сырьем для изучения [2–4]. Облепихи крушиновидной листьев экстракт¹ зарегистрирован в Российской Федерации как лекарственный растительный препарат (ЛРП) противовирусного действия, представляющий собой очищенную фракцию полифенолов — мономерных

¹ <https://grls.rosminzdrav.ru>

гидролизуемых галлоэллаготанинов. Кроме того, в настоящее время ведутся доклинические исследования по выявлению и других видов фармакологической активности экстракта листьев облепихи [5].

По данным Э.Н. Новрузова и соавт. [6], ежегодный запас листьев облепихи только на Большом Кавказе составляет 3–5 т. Результаты ресурсо-ведческой оценки сырьевых запасов листьев на территории Российской Федерации (в культуре и дикорастущем виде) пока в литературе не обсуждены. При этом листья являются побочным продуктом при заготовке основного сырья — плодов.

Согласно данным литературы, листья облепихи крушиновидной содержат различные флавоноиды, извлекаемые в основном спирто-водными смесями. Так, в составе комплекса флавоноидов идентифицированы производные кверцетина, изорамнетина и кемпферола (рутин, кверцетин, мирицетин, лютеолин, витексин, нарциссин и др.) [4, 7–9]. Так как флавоноиды оказывают антиоксидантный эффект, ряд исследований направлен на изучение выраженности этой активности, а также на выбор способа получения извлечений с высоким содержанием флавоноидов (экстракты сухие, спиртовое и водное извлечение) [10–12]. Однако единой валидированной методики определения флавоноидов в данном лекарственном растительном сырье (ЛРС) в настоящее время не существует. При этом целевыми группами БАВ в концепции сквозной стандартизации в цепочке ЛРС — ЛРП следует считать фракцию полифенолов — флавоноидов и дубильных веществ в фармацевтической субстанции растительного происхождения (облепихи крушиновидной листьев экстракт стандартизуется по группе дубильных веществ).

Цель работы — разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной методом спектрофотометрии в видимой области спектра.

Материалы и методы

Объект исследования — собранные на территории Воронежской области в 2022 г. и высушенные

воздушно-теньевым способом до остаточной влажности не более 10% облепихи крушиновидной листья трех фенологических фаз [13] жизни растения (I — фаза завязывания плодов, II — фаза единичного созревания плодов, III — фаза массового созревания плодов).

Для разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях был адаптирован способ, описанный в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ) для ряда ЛРС и основанный на измерении оптической плотности продуктов реакции спиртового (70%) извлечения с алюминия хлоридом. В работе использовали алюминия хлорид 6-водный (99%, АО «БЕКТОН»).

Флавоноиды извлекали из изучаемого ЛРС водно-спиртовыми растворами различных концентраций. К 2,0 мл спиртового извлечения прибавляли 5 мл спиртового раствора алюминия хлорида 5% (в спирте этиловом 70%) и перемешивали. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре СФ-2000 (ЗАО «ОКБ Спектр»). Расчет суммы проводили в пересчете на лютеолин по величине удельного показателя поглощения данного флавоноида в комплексе с алюминия хлоридом, указанной в ГФ РФ и равной 549,41². Выбор аналитической длины волны обоснован максимумом поглощения на дифференциальном спектре анализируемого извлечения с комплексообразователем при 400±2 нм, что характерно для продукта реакции лютеолина с алюминия хлоридом³ [14–17]. Валидация методики проведена в соответствии с требованиями ГФ РФ⁴.

Согласно данным литературы по компонентному составу флавоноидов [4, 8, 9], в образцах листьев облепихи обнаруживается лютеолин. Кроме того, методом тонкослойной хроматографии в анализируемых извлечениях образцов всех фаз заготовки были идентифицированы рутин, гиперозид, кверцетин, лютеолина 7-глюкозид по характерным значениям величин R_f , а также флуоресценции зон адсорбции в ультрафиолетовой зоне спектра после обработки алюминия хлорида спиртовым раствором 5% [18].

Статистическая обработка данных проведена в соответствии с рекомендациями ГФ РФ⁵

² ФС.2.5.0012.15 Душицы обыкновенной трава, ФС.2.5.0029.15 Мята перечной листья, ФС.2.5.0101.18 Тысячелистника обыкновенного трава. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

³ ФС.2.5.0101.18 Тысячелистника обыкновенного трава. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁴ ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁵ ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

при использовании программного обеспечения Microsoft Office Excel.

Результаты и обсуждение

Спектр поглощения спиртового извлечения из листьев облепихи с алюминия хлоридом имел характерные четко выраженные максимумы при длинах волн 320 ± 2 и 400 ± 2 нм, что позволяет рекомендовать лутеолин в качестве стандартного образца (СО) в расчетах содержания суммы флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной и использовать эту длину волны в качестве аналитической. Дифференциальный спектр поглощения извлечения комплекса флавоноидов листьев облепихи крушиновидной с алюминия хлоридом представлен на рисунке 1.

Большинство ЛРС, содержащего флавоноиды, стандартизируют в пересчете на рутин⁶. Так как максимум поглощения рутина соответствует длине волны 410 ± 2 нм, стандартизировать листья облепихи с использованием этого СО целесообразно.

На первом этапе разработки методики провели выбор экстрагента, который позволяет получить максимальный выход флавоноидов из сырья. Согласно данным литературы [7], флавоноиды листьев облепихи не извлекаются органическими слабополярными экстрагентами, такими как петролейный эфир, хлороформ и этилацетат.

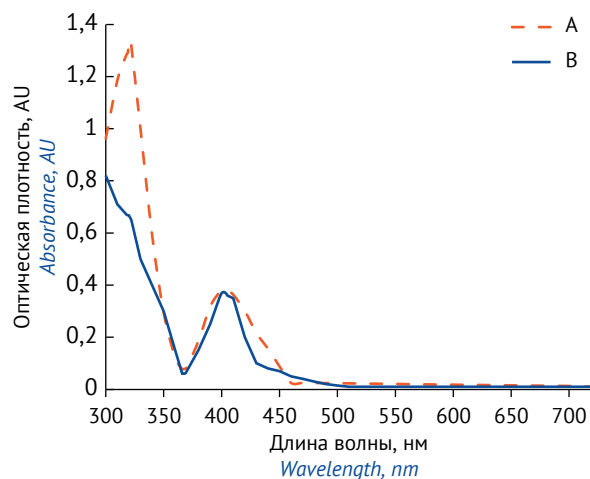


Рис. 1. Спектр поглощения извлечения комплекса флавоноидов из листьев облепихи с алюминия хлоридом (А – собственные данные) и спектр поглощения комплекса стандартного образца лутеолина с алюминия хлоридом (В – [16])

Fig. 1. Absorption spectra of the extract of the complex formed between sea buckthorn leaf flavonoids and aluminium chloride (A, experimental data) and the complex formed between luteolin and aluminium chloride (B, data from [16])

Установлено, что положение максимума поглощения в зависимости от полярности экстрагента менялось незначительно, а наибольшее значение оптической плотности извлечения наблюдалось при использовании спирта этилового в концентрации 70%, что соответствует максимальному выходу флавоноидов (табл. 1).

Для установления полноты экстракции флавоноидов из листьев облепихи крушиновидной изучали влияние на состав извлечения соотношения сырье : экстрагент (табл. 2), кратности экстракции (рис. 2), степени измельчения сырья (табл. 3), а также времени экстракции (рис. 3). Установлено, что с увеличением объема экстрагента наблюдалось возрастание выхода флавоноидов и при соотношении 1:150 выход был максимальным (1,431%). Однако при дальнейшем увеличении объема экстрагента содержание флавоноидов снижалось. Это, вероятно, объясняется полным выходом флавоноидов из листьев облепихи и насыщением раствора.

При выборе степени измельчения были использованы фракции ЛРС с размером частиц 0,2–3,0 мм. Согласно полученным результатам, при уменьшении степени измельчения выход флавоноидов из сырья увеличивался и достигал максимума при извлечении из фракции 0,5–0,2 мм. При экстракции сырья с размером частиц менее 0,2 мм отмечено снижение выхода флавоноидов, что, возможно, связано с плохой смачиваемостью и комкованием сырья.

При исследовании влияния кратности экстракции на выход флавоноидов из листьев облепихи в извлечение установлено, что увеличение кратности не приводит к повышению выхода изучаемых БАВ из сырья. При двукратной экстракции выход флавоноидов оставался на одном уровне (1,499% в пересчете на содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом ЛРС), а при трехкратной – снижался (1,36% в объединенном экстракте с последующим пересчетом на содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом ЛРС).

При выборе оптимального времени экстракции были проанализированы пробы, собранные спустя 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин нагревания. Установлено, что с увеличением длительности экстракции выход флавоноидов возрастал, достигая максимума при нагревании в течение 45 мин, и далее снижался, выходя на плато при нагревании более 60 мин (рис. 2).

При проведении анализа извлечения для определения оптимального времени измерения,

⁶ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

Таблица 1. Влияние состава экстрагента на выход флавоноидов из листьев облепихи (n=3)**Table 1.** Effects of the extraction solvent composition on the yield of sea buckthorn leaf flavonoids (n=3)

Экстрагент <i>Extraction solvent</i>	Полярность экстрагента по Снайдеру [19] <i>Snyder polarity index [19]</i>	Максимум поглощения, нм <i>Absorption maximum, nm</i>	Выход флавоноидов, % <i>Flavonoid yield, %</i>
Вода <i>Water</i>	10,2	401	1,174±0,027
Спирт этиловый 40% <i>Ethyl alcohol, 40%</i>	8,16	401	1,273±0,029
Спирт этиловый 70% <i>Ethyl alcohol, 70%</i>	6,84	403	1,331±0,031
Спирт этиловый 96% <i>Ethyl alcohol, 96%</i>	5,4	404	0,968±0,022

Примечание. n – число параллельных проб. Жирным шрифтом выделен наилучший результат.

Note. n is the number of parallel samples. The best result is highlighted in bold.

Таблица 2. Влияние соотношения сырье : экстрагент на извлечение флавоноидов из листьев облепихи (n=3)**Table 2.** Effects of the raw material to extraction solvent ratio on the extraction of flavonoids from sea buckthorn leaves (n=3)

Соотношение сырье : экстрагент <i>Raw material to extraction:solvent ratio</i>	Содержание суммы флавоноидов, % <i>Total flavonoid content, %</i>
1:25	1,043±0,024
1:50	1,295±0,030
1:100	1,331±0,031
1:150	1,431±0,033
1:200	1,355±0,031
1:250	1,295±0,030

Примечание. n – число параллельных проб. Жирным шрифтом выделен наилучший результат.

Note. n is the number of parallel samples. The best result is highlighted in bold.

необходимого для образования стабильного комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом, оценивали динамику изменения оптической плотности раствора во времени (рис. 3). Рекомендуемое время измерения, согласно экспериментальным данным, составило 30–40 мин.

Точную навеску высушенного сырья, прошедшего сквозь сито с диаметром отверстий 0,5 мм, массой около 1,0 г, помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 150 мл спирта этилового 70% и взвешивали с погрешностью ±0,01 г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане в течение 45 мин при периодическом встряхивании. После нагревания колбу с содержимым охлаждали до комнатной температуры, взвешивали и при необходимости доводили

Таблица 3. Влияние степени измельчения листьев на выход флавоноидов в извлечение (n=3)**Table 3.** Effects of the particle size on the extraction yield of flavonoids (n=3)

Фракции измельченного сырья, мм <i>Fractions of crushed raw material, mm</i>	Содержание суммы флавоноидов, % <i>Total flavonoid content, %</i>
3,0–2,0	1,130±0,026
2,0–1,0	1,331±0,031
1,0–0,5	1,392±0,032
0,5–0,2	1,523±0,035
Менее 0,2	1,421±0,033

Примечание. n – число параллельных проб. Жирным шрифтом выделен наилучший результат.

Note. n is the number of parallel samples. The best result is highlighted in bold.

до первоначальной массы тем же растворителем (спирт этиловый 70%). Объем извлечения фиксировали равным 150 мл. Извлечение фильтровали через 6 слоев марли, отжимая остатки сырья (раствор А).

2,0 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл алюминия хлорида спиртового раствора 5% (в спирте этиловом 70%) и через 10 мин 1 мл уксусной кислоты раствора 3%, перемешивали, доводили объем раствора спиртом этиловым 70% до метки и оставляли на 30 мин при дневном освещении (раствор Б).

К 2,0 мл раствора А в мерной колбе вместимостью 25 мл прибавляли 1 мл уксусной кислоты раствора 3%, доводили спиртом этиловым 70%

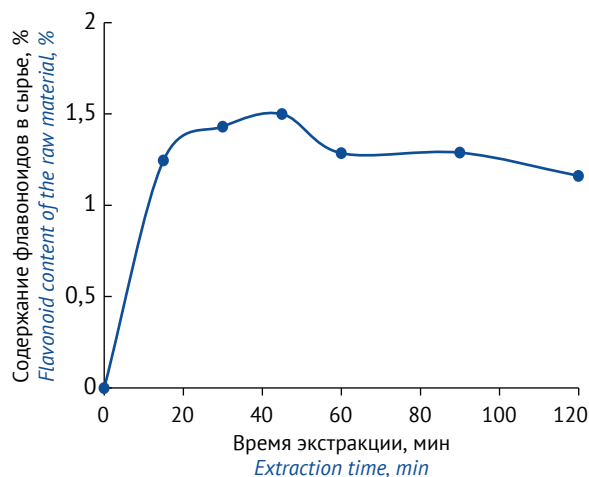


Рис. 2. Влияние времени экстракции на содержание флавоноидов в экстракте

Fig. 2. Effects of the extraction time on the flavonoid content in the extract

до метки и перемешивали (Раствор сравнения. Готовили параллельно с раствором Б).

Через 30 мин измеряли оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре при длине волны 400 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно раствора сравнения.

Содержание суммы флавоноидов (X , %) в пересчете на лютеолин и абсолютно сухое сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100 \times V_{\text{изв}} \times V_{\text{к}}}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times 100 \times a \times (100 - W) \times l \times V_{\text{а}}}, \quad (1)$$

где A — оптическая плотность испытуемого раствора Б; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ — удельный показатель поглощения лютеолина в комплексе с алюминия хлоридом, равный 549,41⁷; $V_{\text{изв}}$ — объем извлечения, мл; $V_{\text{к}}$ — объем мерной колбы, мл;

Таблица 4. Метрологические характеристики методики определения суммы флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной ($P=95\%$; $n=7$)

Table 4. Metrological characteristics of the analytical procedure for determining the total flavonoid content in sea buckthorn leaves ($P=95\%$; $n=7$)

$x_{\text{ср}}$	S^2	S	$Sx_{\text{ср}}$	Δx	$\Delta x_{\text{ср}}$	ϵ , %	$\epsilon_{\text{ср}}$, %
1,394	0,000528	0,023	0,0609	0,0564	0,149	4,046	1,528

Примечание. P — доверительная вероятность; n — число параллельных проб; $x_{\text{ср}}$ — среднее значение результата анализа; S^2 — дисперсия; S — стандартное отклонение; $Sx_{\text{ср}}$ — стандартное отклонение среднего результата; Δx — полуширина доверительного интервала отдельного результата анализа; $\Delta x_{\text{ср}}$ — полуширина доверительного интервала среднего результата; ϵ — относительная ошибка отдельного результата анализа; $\epsilon_{\text{ср}}$ — относительная ошибка среднего результата.

Note. P , confidence level; n , number of parallel samples; $x_{\text{ср}}$, mean of test results; S^2 , variance; S , standard deviation; $Sx_{\text{ср}}$, standard deviation of the mean of test results; Δx , half-width of the confidence interval for an individual test result; $\Delta x_{\text{ср}}$, half-width of the confidence interval for the mean of test results; ϵ , relative error of an individual test result; $\epsilon_{\text{ср}}$, relative error of the mean of test results.

⁷ ФС.2.5.0101.18 Тысячелистника обыкновенного трава. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.



Рис. 3. Динамика изменения оптической плотности извлечения из листьев облепихи во времени

Fig. 3. Changes in the absorbance of the sea buckthorn leaf extract as a function of time

a — навеска сырья, г; W — влажность сырья, %; $V_{\text{а}}$ — объем аликвоты, взятый для разведения, мл; l — толщина слоя в кювете, см.

Проведена метрологическая оценка предложенной методики. В результате установлено, что относительная ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет около 4,046%, т.е. находится в пределах случайной ошибки методики и не превышает 5% (табл. 4).

На заключительном этапе разработки методики проведена ее валидация. Так как данная процедура является обязательной для рекомендации методики к включению в нормативную документацию, были установлены предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, аналитическая область методики, специфичность, прецизионность на уровне сходимости (внутрилабораторной и межлабораторной).

Таблица 5. Схема приготовления растворов для определения линейности методики

Table 5. Scheme for preparation of linearity solutions

Уровень разведения <i>Dilution level</i>	Аликвота раствора А, мл <i>Aliquot of solution A, mL</i>	Объем раствора Б, мл <i>Volume of solution B, mL</i>	Доля от стандартной аликвоты по методике, % <i>Percentage of the standard aliquot for the procedure, %</i>
1	0,1	25	5
2	0,25		12,5
3	0,5		25,0
4	1,0		50,0
5	1,5		75,0
6	2,0		100,0
7	2,5		125,0
8	3,0		150,0
9	3,5		175,0

Специфичность методики оценивали путем сравнения спектров поглощения комплексов СО лутеолина [16] и исследуемого извлечения с алюминия хлоридом (рис. 1).

Линейность определяли на девяти уровнях концентраций (рис. 4). Растворы готовили путем увеличения аликвоты по следующей схеме (табл. 5).

Характеристики линейности методики приведены в таблице 6 и на рисунке 4.

Прецизионность методики на уровне сходимости (внутрилабораторной) определяли в условиях, при которых семь независимых результатов

измерений (n) получали одним и тем же методом, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени. Межлабораторную сходимость определяли в аналогичных условиях и тем же методом, но в другой лаборатории и другим исследователем (табл. 6). Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95% и свидетельствуют о прецизионности методики в условиях повторяемости (табл. 6).

Для исследования динамики накопления флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной проводили также количественное определение данных БАВ в листьях, заготовленных в различные фенологические фазы. Установлено, что наибольшее количество флавоноидов $1,431 \pm 0,033\%$ содержится в листьях, заготовленных в середине июня (фенофаза I), затем оно резко снижается к середине июля до $0,941 \pm 0,022\%$ (фенофаза II) и продолжает постепенно уменьшаться к концу августа — $0,803 \pm 0,018\%$ (фенофаза III). Это связано с тем, что флавоноиды в процессе развития растения подвергаются химическим превращениям (окисление, гидролиз), что приводит к снижению их концентрации к окончанию вегетации.

Для оценки достоверности полученных результатов и влияния условий произрастания растения на накопление флавоноидов в листьях облепихи было проведено сравнение собственных экспериментальных данных с данными других исследователей, заготавливавших листья облепихи на других территориях (табл. 7).

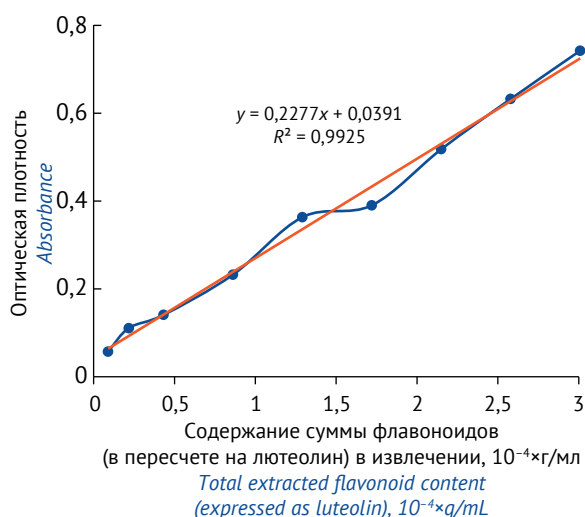


Рис. 4. Зависимость оптической плотности раствора от содержания суммы флавоноидов в пересчете на лутеолин в извлечении из листьев облепихи крушиновидной

Fig. 4. Absorbance of the test solution as a function of the total flavonoid content, expressed as luteolin, in the sea buckthorn leaf extract

Таблица 6. Валидационные характеристики методики спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в пересчете на лутеолин в листьях облепихи крушиновидной**Table 6.** Validation characteristics of the spectrophotometric procedure for the quantification of total flavonoids, expressed as luteolin, in sea buckthorn leaves

Валидационный показатель <i>Validation parameter</i>	Характеристика <i>Characteristics</i>	Результаты <i>Results</i>
Линейность <i>Linearity</i>	Уравнение прямой <i>Linear equation</i>	$y=0,2277x+0,0391$
	Наклон (a) <i>Slope (a)</i>	0,2277
	Отрезок на оси ординат (b) <i>Intercept (b)</i>	0,0391
	Коэффициент корреляции <i>Correlation coefficient</i>	0,9925
	Диапазон линейности (по содержанию флавоноидов в извлечении, г/мл) <i>Linearity range (extracted flavonoids, g/mL)</i>	$0,086-3,01 \times 10^{-4}$
Аналитическая область методики, г/мл <i>Range, g/mL</i>	80–120% от номинального значения определяемой величины <i>80–120% of the nominal value of the measurand</i>	$1,128-1,778 \times 10^{-4}$
Предел обнаружения, г/мл <i>Limit of detection, g/mL</i>	Содержание флавоноидов в 1 мл извлечения <i>Flavonoid content per 1 mL of extract</i>	$8,6 \times 10^{-6}$
Предел количественного определения, г/мл <i>Limit of quantification, g/mL</i>	Содержание флавоноидов, которое может быть определено в 1 мл извлечения количественно <i>Quantifiable flavonoid content per 1 mL of extract</i>	$2,38 \times 10^{-5}$
Повторяемость (внутрилабораторная) <i>Repeatability (intralaboratory)</i>	Содержание флавоноидов (n=7), % (лаборатория 1, исследователь 1) <i>Flavonoid content (n=7), % (Laboratory 1, Operator 1)</i>	1,404 / 1,382 / 1,415 / 1,390 / 1,377 / 1,361 / 1,427
	Среднее значение 1, % <i>Mean value 1, %</i>	1,394
	Доверительный интервал 1 (при P=95%), % <i>Confidence interval 1 (P=95%), %</i>	$1,394 \pm 0,0564$
	Стандартное отклонение 1, % <i>Standard deviation 1, %</i>	2,3
	Коэффициент вариации 1, % <i>Coefficient of variation 1, %</i>	1,65
Повторяемость (межлабораторная) <i>Repeatability (interlaboratory)</i>	Содержание флавоноидов (n=7), % (лаборатория 2, исследователь 2) <i>Flavonoid content (n=7), % (Laboratory 2, Operator 2)</i>	1,409 / 1,405 / 1,409 / 1,399 / 1,386 / 1,433 / 1,416
	Среднее значение 2, % <i>Mean value 2, %</i>	1,408
	Доверительный интервал 2 (при P=95%), % <i>Confidence interval (P=95%), %</i>	$1,408 \pm 0,0355$
	Стандартное отклонение 2, % <i>Standard deviation 2, %</i>	1,45
	Коэффициент вариации 2, % <i>Coefficient of variation 2, %</i>	1,03
	Полученное значение критерия Фишера, вычисленное по результатам проведения испытаний разными исполнителями на разном оборудовании, должно быть меньше табличного значения <i>The F-test value calculated from the results obtained by different operators with different equipment is lower than the critical value</i> $F_{\text{факт}} = s_1^2 / s_2^2 \leq F_{\text{теор}}$	$F_{\text{факт}} = s_1^2 / s_2^2 = 0,00371 / 0,00147 = 2,52$ $F_{\text{теор}} = 4,28$ $F_{\text{факт}} \leq F_{\text{теор}}$

Продолжение таблицы 6

Table 6 (continued)

Валидационный показатель <i>Validation parameter</i>	Характеристика <i>Characteristics</i>	Результаты <i>Results</i>
Правильность <i>Trueness</i>	Свободный член уравнения меньше своего доверительного интервала <i>The y-intercept of the linear equation is lower than its confidence interval</i> $\Delta b = t(0,05, n-1) \times s_b$ $b \leq \Delta b$	$\Delta b = 2,37 \times 0,4192 = 0,9935$ $b \leq \Delta b$ $0,0391 < 0,9935$

Примечание. n — число проб; P — доверительная вероятность; $t(0,05; n-1)$ — коэффициент Стьюдента, где 0,05 — уровень значимости; $F_{\text{практ}}$, $F_{\text{теор}}$ — полученный и табличный критерии Фишера соответственно; s^2 — дисперсия; s — стандартное отклонение; b — свободный член уравнения; s_b — стандартное отклонение свободного члена.

Note. n , number of samples; P , confidence level; t , Student's t-test (significance level=0.05; $n=1$); $F_{\text{практ}}$ and $F_{\text{теор}}$ calculated and critical Fisher's test values, respectively; s^2 , variance; s , standard deviation; b , y-intercept; s_b , standard deviation of the y-intercept.

Таблица 7. Данные литературы по содержанию флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной различных регионов произрастания

Table 7. Literature data on the flavonoid content of sea buckthorn leaves per vegetation region

Район заготовки <i>Harvesting area</i>	Содержание суммы, % <i>Total content, %</i>	Компонентный состав флавоноидов <i>Flavonoid components</i>	Метод определения <i>Quantification method</i>
Польша (г. Липник) [4] <i>Poland (Lipnik)</i>	0,254	—	ВЭЖХ <i>HPLC</i>
Азербайджан (высокогорье Шекинского и Исмаиллинского районов) ⁸ <i>Azerbaijan (highlands of Sheki and Ismayilli districts)</i>	2,5–3,2	Кверцетин, нарциссин, рутин, гликозиды изорамнетина <i>Quercetin, narcissin, rutin, and isorhamnetin glycosides</i>	СФ <i>Spectrophotometry</i>
Румыния [8] <i>Romania</i>	0,826	Рутин, лютеолин, кверцитрин, кверцетин и его гликозиды, мирицетин, витексин, кемпферол <i>Rutin, luteolin, quercitrin, quercetin and its glycosides, myricetin, vitexin, and kaempferol</i>	ВЭЖХ <i>HPLC</i>
Польша (г. Сокулка) [9] <i>Poland (Sokolka)</i>	1,305	Гликозиды кверцетина, изорамнетина и кемпферола <i>Quercetin glycosides, isorhamnetin, and kaempferol</i>	ВЭЖХ <i>HPLC</i>

Примечание. «—» — нет данных.

Note. —, no data.

Полученные результаты коррелируют с данными литературы о содержании суммы флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной.

В результате проведенных исследований в качестве критерия качества сырья по показателю «Количественное определение» можно предложить регламентировать содержание суммы флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной в пересчете на лютеолин на уровне не менее 0,5%. Дальнейшие исследования по оценке стабильности флавоноидов в сырье при хранении в течение рекомендуемого срока годности (2 года) будут продолжены.

Закключение

Разработана и валидирована методика количественного спектрофотометрического опре-

деления суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в листьях облепихи крушиновидной, которая может быть использована для стандартизации данного ЛРС. Проведенный анализ показал, что листья облепихи в зависимости от фенологической фазы содержат 0,8–1,5% флавоноидов и являются перспективным источником флавоноидсодержащего сырья для получения ЛРП и пищевых добавок. Установлено, что наибольшее содержание суммы флавоноидов характерно для фенологической фазы I (сырье заготовлено в середине июня). Постепенное снижение содержания флавоноидов наблюдается в фенологических фазах II (середина июля) и III (конец августа).

В связи с тем что облепиха крушиновидная является источником получения уникального ЛРП — облепихового масла, а ранний сбор

⁸ Багиров ИМ. Фармакогностическое изучение растений семейства лоховые: автореф. дисс. ... канд. фарм. наук. М.; 2010.

листьев может привести к снижению его качества согласно фармакопейным требованиям, считаем, что рекомендуемый срок заготовки листьев должен совпадать со сбором плодов,

так как листья на данном этапе роста и развития еще содержат достаточное количество флавоноидов (до 0,8%) и могут быть использованы как самостоятельное ЛРС для получения ЛРП.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Михеев АМ, Деменко ВИ. Облепиха. М.: Росагропромиздат; 1990.
Mikheev AM, Demenko VI. *Sea buckthorn*. Moscow: Rosagropromizdat; 1990 (In Russ.).
2. Хасенова АБ, Аралбаева АН, Утегалиева РС, Маматаева АТ, Мурзахметова МК. Облепиха крушиновидная (*Hippophae rhamnoides* L.) – источник биоактивных веществ. *Вестник Алматинского технологического университета*. 2020;(1):82–8.
Khassenova AB, Aralbaeva AN, Utegalyieva RS, Mamataeva AT, Murzakmetova MK. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) is a source of bioactive substances. *The Journal of the Almaty Technological University*. 2020;(1):82–8 (In Russ.).
EDN: [ITGNOG](#)
3. Абдыкаликова КА, Нечипоренко ЛП. Фитохимический состав надземной части облепихи крушиновидной. *Естественные науки*. 2008;(4):104–7.
Abdykalikova KA, Nechiporenko LP. Phytochemical composition of the aboveground part of sea buckthorn. *Natural Sciences*. 2008;(4):104–7 (In Russ.).
EDN: [ZELKAO](#)
4. Jaroszewska A, Biel W. Chemical composition and antioxidant activity of leaves of mycorrhized sea-buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Chil J Agric Res*. 2017;77(2):155–62.
<https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000200155>
5. Suryakumar G, Gupta A. Medicinal and therapeutic potential of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J Ethnopharmacol*. 2011;138(2):268–78.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.024>
6. Новрузов ЭН, Мамедов ЗГ, Мустафаева ЛА, Мирюсифова ХМ, Зейналова АМ. Состав и содержание флавоноидов листьев *Hippophae rhamnoides* L., произрастающих в Азербайджане. *Химия растительного сырья*. 2018;(3):209–14.
Novruzov EN, Mamedov ZG, Mustafaeva LA, Miryusifova KhM, Zeynalova AM. Composition and content of flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L. leaves growing in Azerbaijan. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2018;(3):209–14 (In Russ.).
<https://doi.org/10.14258/jcprm.2018033772>
7. Dharam PA, Amrit KS, Jyoti K, Tanveer N. Pharmacognostical characterization and preliminary phytochemical investigation of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;2(2):108–13.
<https://doi.org/10.35652/IGJPS.2012.13>
8. Criste A, Urcan AC, Bunea A, Furtuna FRP, Olah NK, Madden RH, et al. Phytochemical composition and biological activity of berries and leaves from four Romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Molecules*. 2020;25(5):1170.
<https://doi.org/10.3390/molecules25051170>
9. Tkacz K, Wojdyło A, Turkiewicz P, Nowicka P. Triterpenoids, phenolic compounds, macro- and microelements in anatomical parts of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries, branches and leaves. *J Food Compos Anal*. 2021;103:104107.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104107>
10. Нилова ЛП, Малютенкова СМ. Антиоксидантные комплексы облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) северо-запада России. *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*. 2021;83(1):108–14.
Nilova LP, Malyutenkova SM. Antioxidant complexes of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) of north-west Russia. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2021;83(1):108–14 (In Russ.).
<https://doi.org/10.20914/2310-1202-2021-1-108-114>
11. Kumar MS, Dutta R, Prasad D, Misra K. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant activity. *Food Chem*. 2011;127(3):1309–16.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.088>
12. Ji M, Gong X, Li X, Wang C, Li M. Advanced research on the antioxidant activity and mechanism of polyphenols from *Hippophae* species—a review. *Molecules*. 2020;25(4):917.
<https://doi.org/10.3390/molecules25040917>
13. Исачкин АВ, Зубик ИН, Потапова АВ, Ермаков МА. Корреляционный анализ фенофаз и феноинтервалов у сортов облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) в коллекции ГБС РАН им. Н.В. Цицина. *Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии*. 2019;(2):64–9.
Isachkin AV, Zubik IN, Potapova AV, Ermakov MA. Correlation analysis of phenophases and pheno intervals in varieties of buckwheat (*Hippophae rhamnoides* L.) in the collection of GBS RAS IM. N.V.CYSTSINA. *Bulletin of the Kursk State Agricultural Academy*. 2019;(2):64–9 (In Russ.).
EDN: [ZBKJHV](#)
14. Коруткин ДЮ, Абилов ЖА, Музычкина РА, Толстиков ГА. *Природные флавоноиды*. Новосибирск: Тео; 2007.
Korutkin DYU, Abilov ZhA, Muzychkina RA, Tolstikov GA. *Natural flavonoids*. Novosibirsk: Geo; 2007 (In Russ.).
15. Лесовая ЖС, Писарев ДИ, Новиков ОО, Романова ТА. Разработка методики количественного определения флавоноидов в траве манжетки обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L.S.L. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2010;22–2(93):145–9.
Lesovaya ZhS, Pisarev DI, Novikov OO, Romanova TA.

- Development of methods of quantitative determination of flavonoids in *Alchemilla vulgaris* L.S.L. *Belgorod State University Scientific Bulletin. Series: Medicine. Pharmacy*. 2010;22–2(93):145–9 (In Russ.).
EDN: [NDAWKL](#)
16. Дроздова ИЛ, Лупилина ТИ. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в траве икотника серого. *Человек и его здоровье*. 2016;(1):106–12.
Drozdova IL, Lupilina TI. Development and validation of methods of quantitative determination of flavonoids in *Berteroia incana* herb. *Humans and Their Health*. 2016;(1):106–12 (In Russ.).
EDN: [VSZEKY](#)
17. Тринеева ОВ, Рудая МА, Перова ИБ, Сливкин АИ, Эллер КИ. Изучение профиля флавоноидов плодов облепихи крушиновидной различных сортов. *Биофармацевтический журнал*. 2021;13(3):22–9.
Trineeva OV, Rudaya MA, Perova IB, Slivkin AI, Eller KI. Studying the profile of flavonoids of fruits of sea buckthorn various varieties. *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2021;13(3):22–9 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30906/2073-8099-2021-13-3-22-29>
18. Олешко ОА, Кондратьева НА. Определение подлинности и количественного содержания биологически активных веществ в экстракте неомикон сухом. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;(2–3):238.
Oleshko OA, Kondratyeva NA. Determination of authenticity and the quantitative content of biologically active agents in neomicon extract dry. *Modern Problems of Science and Education*. 2015;(2–3):238 (In Russ.).
EDN: [VBRFQT](#)
19. Рудаков ОБ, Востров ИА, Федоров СВ, Филиппов АА, Селеменев ВФ, Приданцев АА. *Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии*. Воронеж: Водолей; 2003.
Rudakov OB, Vostrov IA, Fedorov SV, Filippov AA, Selemenev VF, Pridantsev AA. *A chromatographer's companion. Methods of liquid chromatography*. Voronezh: Vodoley; 2003 (In Russ.).

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Н.А. Ковалёва — валидация разработанной методики; О.В. Тринеева — расчеты и статистическая обработка полученных результатов, написание текста рукописи; И.В. Чувикова — разработка методики; А.И. Сливкин — утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Natalia A. Kovaleva validated the analytical procedure. Olga V. Trineeva carried out calculations and statistical analysis of the results and drafted the manuscript. Irina V. Chuvikova developed the analytical procedure. Alexey I. Slivkin approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Ковалёва Наталья Александровна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3507-5665>
natali-sewer@yandex.ru

Тринеева Ольга Валерьевна, д-р фарм. наук, доцент

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1421-5067>
trineevaov@mail.ru

Чувикова Ирина Вячеславовна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5333-0781>
ira.chuvikova.01@mail.ru

Сливкин Алексей Иванович, д-р фарм. наук, профессор

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6934-0837>
slivkin@pharm.vsu.ru

Natalia A. Kovaleva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3507-5665>
natali-sewer@yandex.ru

Olga V. Trineeva, Dr. Sci. (Pharm.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1421-5067>
trineevaov@mail.ru

Irina V. Chuvikova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5333-0781>
ira.chuvikova.01@mail.ru

Alexey I. Slivkin, Dr. Sci. (Pharm.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6934-0837>
slivkin@pharm.vsu.ru

Поступила 12.01.2023

После доработки 27.02.2023

Принята к публикации 07.03.2023

Online first 19.05.2023

Received 12 January 2023

Revised 27 February 2023

Accepted 7 March 2023

Online first 19 May 2023