

УДК 615.322, 615.072

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

DOI: 10.37903/vsgma.2023.4.27 EDN: XGZOCP

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
КАРОТИНОИДОВ И ХЛОРОФИЛЛОВ В ЛИСТЬЯХ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ**  
© Ковалёва Н.А., Тринеева О.В., Колотнева А.И.*Воронежский государственный университет, Россия, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1**Резюме*

**Цель.** разработать и валидировать спектрофотометрическую методику количественного определения каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной.

**Методика.** Объект исследования – высушенные (влажность не более 10%) листья облепихи крушиновидной. Разработка методики спектрофотометрического определения каротиноидов и хлорофиллов проведена на основе определения аналогичных соединений в листьях крапивы двудомной. Валидация проведена в соответствии с Государственной фармакопеей XIV издания.

**Результаты.** При подборе оптимальной степени измельчения использовали сырьё 5-ти фракций, причём с уменьшением размера частиц выход каротиноидов и хлорофиллов возрастал. При выборе экстрагента сравнивали выход веществ при экстракции спиртом этиловым в концентрациях 70 и 96%об., но наилучший выход наблюдался при использовании этанола 70%об., так как, согласно литературным данным, каротиноиды и хлорофиллы лучше экстрагируются водно-спиртовыми смесями. При подборе времени наблюдалось возрастание выхода веществ в извлечение с увеличением продолжительности экстракции с максимумом при 45 минутах. При увеличении кратности экстракции до 2-х выход каротиноидов и хлорофиллов увеличивался, снижаясь при использовании 3-х кратной экстракции. Влияние фильтрующего материала связано с возможным забиванием пор бумажного фильтра сопутствующими высокомолекулярными веществами и адсорбции целевых веществ на поверхности этих соединений. Валидация методики проведена по таким критериям, как прецизионность на уровне сходимости, предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, аналитическая область методики, специфичность.

**Заключение.** Оптимальной степенью измельчения, при которой наблюдается максимальный выход каротиноидов и хлорофиллов из сырья, является 0,5-1,0 мм, экстракцию рекомендовано проводить спиртом этиловым 70%об. при соотношении сырьё:экстрагент 1: 200 в течение 45 минут двукратно. Разработанная методика валидна и пригодна для спектрофотометрического определения каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной.

*Ключевые слова:* листья облепихи крушиновидной, хлорофиллы, каротиноиды, спектрофотометрия, валидация

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION  
OF CAROTENOIDS AND CHLOROPHYLLS OF SEA BUCKTHORN LEAVES**

Kovaleva N.A., Trineeva O.V., Kolotneva A.I.

*Voronezh State University, 1, Universitetskaya Pl., 394018, Voronezh, Russia**Abstract*

**Objective.** The aim is to develop and validate a spectrophotometric method for the quantitative determination of carotenoids and chlorophylls in sea buckthorn leaves.

**Methods.** The object of the study is dried (humidity not more than 10%) leaves of sea buckthorn. The development of a technique for the spectrophotometric determination of carotenoids and chlorophylls was carried out on the basis of the determination of similar compounds in the leaves of stinging nettle. Validation was carried out in accordance with the State Pharmacopoeia XIV edition.

**Results.** When selecting the optimal degree of grinding, raw materials of 5 fractions were used, and with a decrease in the particle size, the yield of carotenoids and chlorophylls increased. When choosing an extractant, we compared the yield of substances during extraction with ethyl alcohol at concentrations of

70 and 96% vol., but the best yield was observed when using ethanol 70% vol., since, according to the literature data, carotenoids and chlorophylls are better extracted with water-alcohol mixtures. When choosing the time, an increase in the yield of substances in the extraction was observed with an increase in the duration of extraction with a maximum at 45 minutes. With an increase in the extraction ratio to 2, the yield of carotenoids and chlorophylls increased, decreasing when using a 3-fold extraction. The influence of the filter material is associated with the possible clogging of the pores of the paper filter with the accompanying macromolecular substances and the adsorption of target substances on the surface of these compounds. The validation of the method was carried out according to such criteria as precision at the level of convergence, limit of detection, limit of quantification, linearity, analytical area of the method, specificity.

**Conclusion.** The optimal degree of grinding, at which the maximum yield of carotenoids and chlorophylls from raw materials is observed, is 0.5-1.0 mm; extraction is recommended to be carried out with ethyl alcohol 70% vol. at a ratio of raw material: extractant 1: 200 for 45 minutes twice. The developed method is valid and suitable for spectrophotometric determination of carotenoids and chlorophylls in sea buckthorn leaves.

*Keywords:* sea buckthorn leaves, chlorophylls, carotenoids, spectrophotometry, validation

## Введение

Облепиха крушиновидная – ценное лекарственное растение, плоды которого богаты каротиноидами, витаминами и используются для получения облепихового масла пищевого и фармацевтического назначения. Препараты на его основе (суппозитории, ректокапсулы, масло для приема внутрь и наружного применения) применяются в качестве средств, ускоряющих репаративные процессы при раневых повреждениях, а также при язве желудка и двенадцатиперстной кишки, геморроидальных трещинах. Помимо плодов, заготовке также подлежат и листья облепихи с целью получения экстракта, содержащего полифенольный комплекс, для производства противовирусного препарата «Гипорамин» [12,17].

Богатый химический состав обуславливает широкий спектр фармакологической активности, среди которых выделяют противовирусную, противовоспалительную, антиоксидантную и адаптогенную активности. Ряд российских и зарубежных исследователей активно занимаются изучением возможных видов активности экстрактов из листьев облепихи (спиртовые, водно-спиртовые, водные) [6,10,18-21]. Следует отметить, что, согласно литературным данным, экстракты показывают отличные результаты в оценке токсичности при исследованиях *in vivo*. При оценке цитотоксичности водного экстракта из листьев облепихи установлено, что в концентрации 25-400 г/мл не обнаружено цитотоксического влияния на обработанные клетки. При оценке острой токсичности в дозе 5 г/кг массы тела животного не отмечено смерти или ухудшения состояния ни одного из животных. С целью оценки кожной токсичности водный экстракт вводили в дозе 1 г/кг/сут в течение 28 дней, в результате чего не выявлено существенных изменений в массе тела животных, биохимических показателях крови, а также гистологических изменений [22].

Листья облепихи крушиновидной являются перспективным лекарственным растительным (ЛРС) сырьём благодаря богатому составу биологически активных веществ (БАВ), включающему такие соединения как, флавоноиды, дубильные вещества, органические, полиненасыщенные жирные кислоты и аминокислоты, витамины (А, С, Е). Флавоноиды в листьях представлены лютеолином, рутином, изорамнетином, нарциссином, стриктинином; дубильные вещества представлены гидролизуемыми танинами (галловая кислота, катехин, эпикатехин); жирные кислоты – линолевая, линоленовая; а среди аминокислот основными являются лизин, глутаминовая кислота, аргинин, пролин и др., в том числе незаменимые [1-2,4,8,11,14-16]. В то же время состав и содержание липофильной фракции БАВ в листьях (каротиноидов и хлорофиллов) изучено мало. Однако, следует учитывать, что активно изучаемые на предмет выявления различных видов фармакологической активности спирто-водные извлечения из листьев характеризуются многокомпонентным составом БАВ (в т.ч. присутствуют каротиноиды и хлорофиллы), а следовательно, и комплексным характером действия. Поэтому всестороннее изучение химического состава БАВ ЛРС является актуальной задачей.

Подводя итог вышеописанному, листья облепихи крушиновидной являются ценным и перспективным ЛРС с целью разработки лекарственных растительных препаратов (ЛРП) с различной фармакологической активностью и низкой токсичностью.

Цель исследования – разработать и валидировать спектрофотометрическую методику количественного определения каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной.

## Методика

Объект исследования – заготовленные на территории Воронежской области в 2022 году и высушенные воздушно-теньевым способом до остаточной влажности не более 10% листья облепихи крушиновидной трёх фаз развития (I - фаза завязывания плодов, II – фаза единичного созревания плодов, III – фаза массового созревания плодов).

За основу была взята методика прямого спектрофотометрического определения хлорофиллов, каротиноидов и гидроксикоричных кислот в листьях крапивы двудомной, основанная на извлечении БАВ из сырья подходящим растворителем и измерении оптической плотности на спектрофотометре СФ-2000 в максимумах поглощения при длинах волн  $442\pm 2$  нм (каротиноиды) и  $667\pm 3$  нм (хлорофиллы) [13]. Валидация методики проведена в соответствии с ОФС «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XIV издания [3]. Статистическая обработка результатов проведена в Microsoft Excel 2016.

## Результаты исследования и их обсуждение

На начальном этапе методом ТСХ было установлено наличие в листьях облепихи каротиноидов и хлорофиллов. Идентифицированы такие соединения, как феофитин, ксантофиллы, хлорофилл b, хлорофилл a и  $\beta$ -каротин [7].

Электронные спектры (рис. 1) поглощения измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (РФ, ОКБ «Спектр», СПб) в кварцевых кюветках с толщиной поглощающего слоя 10 мм в диапазоне волн 400-800 нм. При изучении спектральных характеристик извлечений из листьев облепихи крушиновидной наблюдали основные максимумы поглощения в области  $455\pm 5$  нм, характерные для каротиноидов ( $\gamma$ -каротин и другие фракции), и  $667\pm 3$  нм, свойственные для хлорофилла.

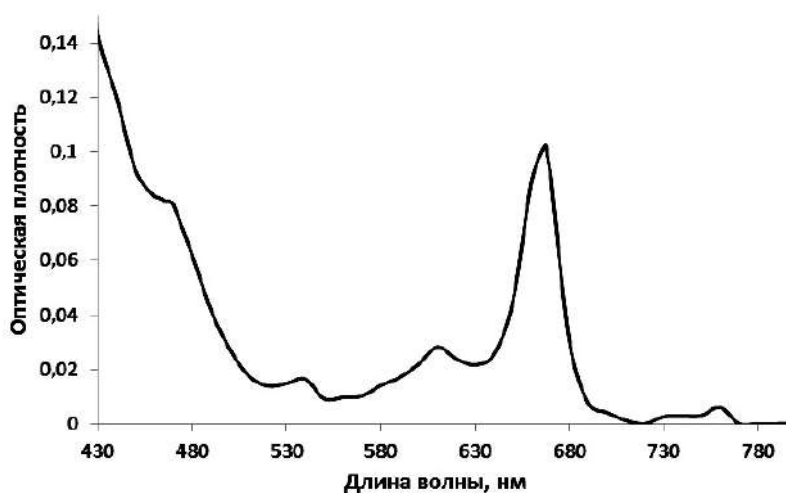


Рис. 1. Спектр поглощения спиртового извлечения из листьев облепихи крушиновидной

На начальном этапе нами осуществлён подбор степени измельчения листьев облепихи при экстракции спиртом этиловым 96% в течение 30 минут однократно. Согласно полученным результатам, наибольший выход каротиноидов и хлорофиллов отмечен для сырья со степенью измельчения 0,5-1,0 мм (табл. 1). Несмотря на максимальный выход этих соединений при степени измельчения 0,2 мм, использование данной фракции нецелесообразно в связи с необходимостью двух-трёхкратного фильтрования мутных извлечений. Даже в этом случае частицы сырья попадают в фильтрат, что приводит к увеличению значений оптической плотности и, как следствие, завышенным результатам содержания определяемых БАВ.

Таблица 1. Влияние степени измельчения листьев на выход каротиноидов и хлорофиллов в извлечение

Фракции измельченного сырья, мм	Содержание каротиноидов, %	Содержание хлорофиллов, %
3,0-2,0	0,021±0,00002	0,067±0,0002
2,0-1,0	0,039±0,00004	0,118±0,0004
1,0-0,5	0,047±0,00005	0,141±0,0005
0,5-0,2	0,044±0,00005	0,149±0,0041
Менее 0,2	0,050±0,00005	0,159±0,0005

На следующем этапе разработки методики провели выбор экстрагента, который позволяет получить максимальный выход каротиноидов и хлорофиллов из сырья. Экстракцию осуществляли спиртом этиловым в концентрации 70 и 96% согласно рекомендациям литературы [13]. Установлено, что положения максимумов менялись незначительно, а наибольшее значение оптической плотности извлечения наблюдалось при использовании спирта этилового в концентрации 96%, что соответствует максимальному выходу хлорофиллов и каротиноидов (табл. 2).

Таблица 2. Влияние экстрагента на выход хлорофиллов и каротиноидов из листьев облепихи

Экстрагент	Максимум поглощения каротиноидов, хлорофиллов нм	Выход каротиноидов, %	Выход хлорофиллов, %
Спирт этиловый 70%	460±5 665±5	0,042±0,00005	0,102±0,0003
Спирт этиловый 96%	460±5 665±5	0,047±0,00005	0,141±0,0005

При выборе оптимального времени экстракции (рис. 2) были проанализированы пробы, собранные в 5 точках: после 30, 45, 60, 90 и 120 мин нагревания на водяной бане с обратным холодильником. В результате было установлено, что с увеличением длительности экстракции выход хлорофиллов и каротиноидов возрастал, достигая максимума при 45 мин., и далее снижался, выходя на плато после 60 мин.

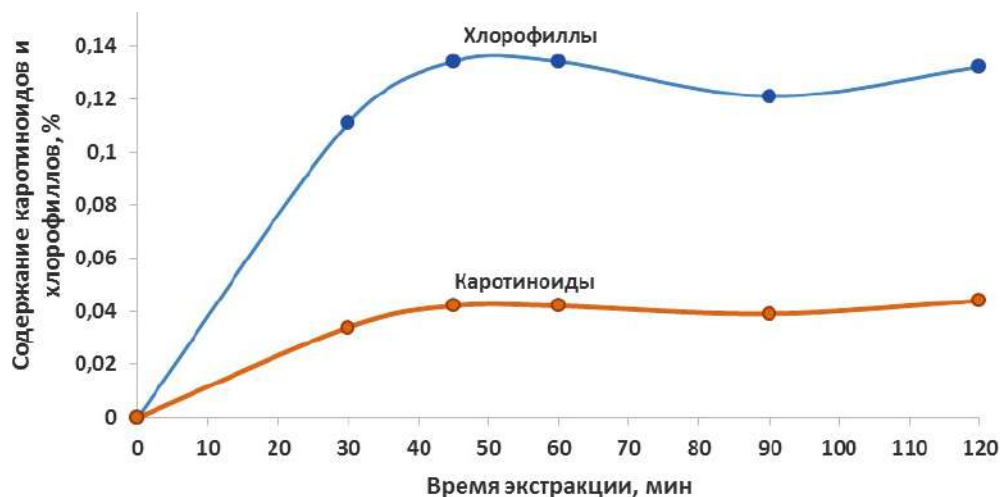


Рис. 2. Влияние времени экстракции на содержание каротиноидов и хлорофиллов в извлечении

Для установления полноты экстракции каротиноидов и хлорофиллов из листьев облепихи крушиновидной изучали влияние соотношения сырье-экстрагент (табл. 3). В результате установлено, что с увеличением объема экстрагента наблюдалось возрастание выхода каротиноидов и хлорофиллов и при соотношении 1:200 выход был максимальным (0,053% – каротиноиды, 0,167% – хлорофиллы). Дальнейшее увеличение объема экстрагента является нецелесообразным, т.к. приведет к значительному удорожанию стоимости единицы продукции в связи с большим расходом экстрагента, не приводя к значительному росту выхода анализируемых БАВ.

Таблица 3. Влияние соотношения сырье-экстрагент на извлечение флавоноидов из листьев облепихи

Соотношение сырье-экстрагент	Содержание каротиноидов, %	% увеличения выхода БАВ	Содержание хлорофиллов, %	% увеличения выхода БАВ
1:25	0,027±0,00003	100	0,087±0,0003	100
1:50	0,036±0,00004	+33,33	0,113±0,0004	+29,89
1:100	0,042±0,00005	+16,70	0,134±0,0004	+18,58
1:150	0,050±0,00005	+19,05	0,163±0,0005	+21,64
1:200	0,053±0,00006	+6,0	0,167±0,0006	+2,45

При определении содержания каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной различных фаз развития (табл. 4) установлено, что наиболее богатой данными соединениями является фаза массового созревания плодов (III).

Таблица 4. Содержание каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной различных фаз вегетации

Фенологическая фаза	Фенофаза I	Фенофаза II	Фенофаза III
Содержание каротиноидов, %	0,050±0,0001	0,043±0,00005	0,070±0,00008
Содержание хлорофиллов, %	0,163±0,0005	0,123±0,0004	0,179±0,0006

На заключительном этапе осуществляли варьирование кратностью экстракции (одно-, двух- и трёхкратная экстракция). Результаты представлены в табл. 5. Согласно полученным данным, наибольший выход каротиноидов и хлорофиллов отмечен при двукратной экстракции.

Таблица 5. Влияние кратности экстракции на выход БАВ в извлечение

Кратность	Содержание каротиноидов, %	Содержание хлорофиллов, %
1	0,053±0,00006	0,167±0,0006
2	0,054±0,00006	0,177±0,0006
3	0,048±0,00005	0,159±0,0005

Большинство методик по определению БАВ в ЛРС предлагают использовать в качестве фильтрующего материала бумажный фильтр. С целью выявления влияния способа фильтрования проведена сравнительная оценка содержания каротиноидов и хлорофиллов в извлечениях при фильтрации через бумажный фильтр и через марлю (10 слоёв) (табл. 6). Установлено, что при использовании бумажного фильтра процесс более длителен (фильтрация одной порции при двукратной экстракции осуществляется 40-50 минут). При использовании марли наблюдается большее содержание БАВ в извлечениях (примерно на 30%). Предположительно, это объясняется тем, что в порах бумажного фильтра задерживаются балластные вещества высокомолекулярной структуры (слизи, полисахариды и др.), забивая поры и сорбируя на своей поверхности молекулы каротиноидов и хлорофиллов. На основании этого использование марли в качестве фильтрующего материала целесообразно.

Таблица 6. Влияние фильтрующего материала на выход БАВ в извлечение

Кратность	Содержание каротиноидов, %	Содержание хлорофиллов, %
Бумажный фильтр	0,054±0,00006	0,177±0,0006
Марля (10 слоёв)	0,096±0,0001	0,228±0,0008

Методика количественного определения: около 1,0 г (точная навеска) высушенных и измельчённых листьев до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, заливали 100 мл спирта этилового 70%об., взвешивали и в течение 45 минут проводили кипячение на водяной бане с обратным холодильником. По истечении времени колбу с экстрактом быстро охлаждали, доводили объём растворителя по массе до первоначального значения и фильтровали через 10 слоёв марли. Экстракцию повторяли второй порцией растворителя. Фильтраты объединяли в мерной колбе вместимостью 200 мл и доводили до метки тем же растворителем (раствор А). 10 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки тем же этанолом (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре СФ-2000 (Россия, СПб, ОКБ

«Спектр») при длинах волн  $460 \pm 5$  нм, характерных для каротиноидов, и  $665 \pm 5$  нм, характерных для хлорофиллов, в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно растворителя (спирт этиловый 70%об.). Содержание суммы каротиноидов (в пересчёте на  $\beta$ -каротин) и суммы хлорофиллов (в пересчёте на хлорофилл а) в процентах (X) в пересчёте на абсолютно сухое сырьё рассчитывали по формулам (1 и 2, соответственно):

$$X = \frac{A \times W_1 \times W_2 \times 100\% \times 100\%}{m \times E_{1\text{см}}^{1\%} \times 100 \times V_a \times (100\% - B)} = \frac{A \times 200 \times 25 \times 100 \times 100}{m \times 2500 \times 100 \times 10 \times (100 - B)} \quad (1)$$

$$X = \frac{A \times W_1 \times W_2 \times 100\% \times 100\%}{m \times E_{1\text{см}}^{1\%} \times 100 \times V_a \times (100\% - B)} = \frac{A \times 200 \times 25 \times 100 \times 100}{m \times 944,5 \times 100 \times 10 \times (100 - B)} \quad (2)$$

, где  $A$  – оптическая плотность раствора Б в соответствующем максимуме поглощения;  $m$  – масса сырья, г;  $B$  – потеря в массе при высушивании сырья, %;  $E_{1\text{см}}^{1\%}$  – удельный показатель поглощения (2500 для  $\beta$ -каротин при  $450 \pm 5$  нм; 944,5 для хлорофилла при  $663 \pm 5$  нм);  $W_1$  и  $W_2$  – объёмы мерных колб, использованных для разведения, мл;  $V_a$  – объём аликвоты, взятый на анализ, мл.

Проведена метрологическая оценка разработанной методики. Относительная ошибка единичного определения составляет 3,54% для хлорофиллов и 2,74% для каротиноидов (с доверительной вероятностью 95%), что свидетельствует о нахождении в пределах средней ошибки (до 5%) (табл. 7).

Таблица 7. Метрологическая характеристика методики определения каротиноидов (1) и хлорофиллов (2) (P=95%; n=7)

БАВ	$X_{\text{ср}}$	$S^2$	S	$Sx_{\text{ср}}$	$\Delta x$	$\Delta x_{\text{ср}}$	$\varepsilon, \%$	$\varepsilon_{\text{ср}}, \%$
1	0,0957	0,00000115	0,00107	0,000404	0,00262	0,00099	2,738	1,034
2	0,228	0,0000108	0,00329	0,00124	0,00806	0,00304	3,535	1,333

Так как валидация является обязательным завершающим этапом разработки методики количественного определения, нами выполнена оценка методики по следующим критериям: прецизионность на уровне сходимости, предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, аналитическая область методики, специфичность.

Специфичность методики оценивали по совпадению положения максимумов на спектрах поглощения индивидуальных хлорофиллов, каротиноидов (литературные данные) и исследуемого извлечения (рис. 1). Для хлорофилла а характерен узкий максимум поглощения, расположенный при 662 нм, а для  $\beta$ -каротина – широкий пологий максимум с плечом в диапазоне 450-455 нм [9].

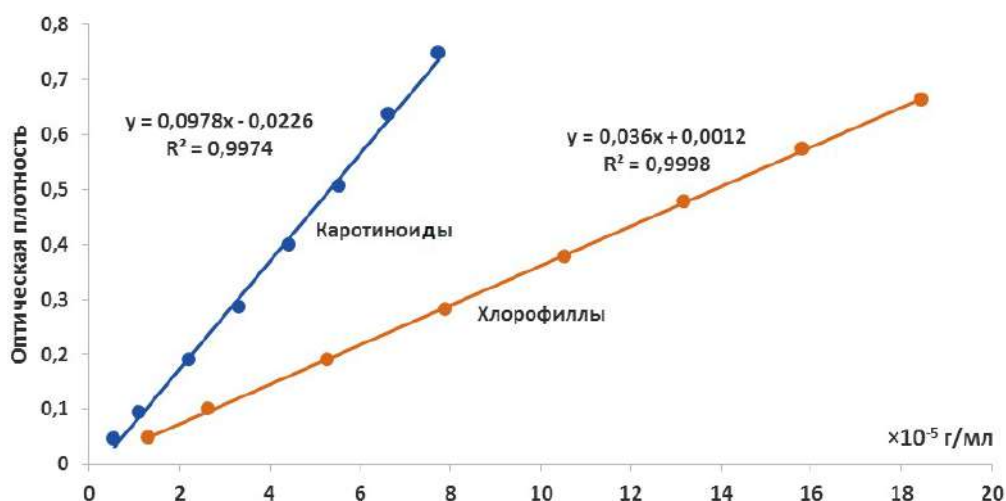


Рис. 3. График линейности методики

Линейность определяли на восьми уровнях концентраций. График, уравнение линейности и коэффициент аппроксимации представлены на рис. 3. Так как  $R^2$  и по определению каротиноидов, и по определению хлорофиллов более 0,99, можно сделать вывод, что область линейности методики находится в диапазоне концентраций от  $0,55$  до  $7,74 \times 10^{-5}$  г/мл (каротиноиды) и от  $1,32$  до  $18,45 \times 10^{-5}$  г/мл (хлорофиллы). Предел обнаружения –  $0,55$  и  $1,32 \times 10^{-5}$  г/мл каротиноидов и хлорофиллов данной методикой, соответственно. Аналитическая область методики составляет 80-

120% от номинальной величины ( $3,32-5,55 \times 10^{-5}$  г/мл для каротиноидов и  $7,91-13,18 \times 10^{-5}$  г/мл для хлорофиллов). Предел количественного обнаружения каротиноидов по данной методике составляет  $5,55 \times 10^{-5}$  г/мл, хлорофиллов –  $15,81 \times 10^{-5}$  г/мл. Прецизионность оценивали на уровне сходимости путём получения семи независимых результатов в одной и той же лаборатории, одним и тем же исследователем по одной и той же методике с использованием того же оборудования за короткий промежуток времени. Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при доверительной вероятности 95% и свидетельствуют о прецизионности методики в условиях повторяемости (табл. 8).

Таблица 8. Прецизионность методики определения каротиноидов и хлорофиллов (P=95%; n=7)

Каротиноиды			Хлорофиллы		
Проба	Оптическая плотность	Содержание, %	Проба	Оптическая плотность	Содержание, %
1	0,4497	0,0972	1	0,4058	0,232
2	0,4480	0,0969	2	0,4064	0,233
3	0,4440	0,0960	3	0,3978	0,228
4	0,4363	0,0943	4	0,3948	0,226
5	0,4408	0,0953	5	0,3976	0,228
6	0,4401	0,0951	6	0,3952	0,226
7	0,4390	0,0949	7	0,3915	0,224
Наименьшее значение, % = 0,0943 Наибольшее значение, % = 0,0972 Среднее значение, % = 0,0957 Доверительный интервал (P=95%), % = $0,0957 \pm 0,00262$ Стандартное отклонение, % = 0,107 Коэффициент вариации, % = 1,118			Наименьшее значение, % = 0,224 Наибольшее значение, % = 0,233 Среднее значение, % = 0,228 Доверительный интервал (P=95%), % = $0,228 \pm 0,00806$ Стандартное отклонение, % = 0,329 Коэффициент вариации, % = 1,443		

В результате проведенных исследований в качестве критерия качества сырья по показателю «Количественное определение» можно предложить регламентировать содержание суммы каротиноидов, в пересчёте на  $\beta$ -каротин не менее 0,08% (80 мг%) и содержание суммы хлорофиллов – не менее 0,2%.

Для оценки перспективности листьев облепихи крушиновидной в качестве источника данных групп БАВ, интересным представлялось сравнить полученные экспериментальные результаты по содержанию каротиноидов и хлорофиллов в образцах листьев с литературными данными [5] по другим фармакопейным представителям лекарственных растений (табл. 9).

Таблица 9. Литературные данные по содержанию каротиноидов и хлорофиллов в образцах листьев других фармакопейных представителей лекарственных растений

№	Название вида	Содержание хлорофиллов, %	Содержание каротиноидов, %
1	<i>Tanacetum achilleifolium</i> (M. Bieb.) Sch. Bip.	0,652	0,108
2	<i>Thymus marschallianus</i> Willd.	0,584	0,104
3	<i>Potentilla glaucescens</i> Schltdl.	0,581	0,078
4	<i>Salvia stepposa</i> Des.- Shost.	0,469	0,119
5	<i>Artemisia austriaca</i> Jacq.	0,512	0,079
6	<i>Centaurea turgica</i> Klok.	0,520	0,062
7	<i>Fragaria viridis</i> (Duchesne) Weston	0,450	0,111

## Заключение

Таким образом, разработана и валидирована методика количественного определения суммы каротиноидов (в пересчёте на  $\beta$ -каротин) и хлорофиллов методом спектрофотометрии в листьях облепихи крушиновидной, которая может быть использована для стандартизации данного ЛРС. В результате исследований установлено, что оптимальной степенью измельчения, при которой наблюдается максимальный выход каротиноидов и хлорофиллов из сырья, является фракция 0,5-1,0 мм, экстракцию рекомендовано проводить спиртом этиловым 70%об. при соотношении сырья:

экстракт 1:200 мл в течение 45 минут двухкратно. Наибольшее содержание определяемых соединений наблюдается в листьях фенологической фазы III (период заготовки – конец августа – начало сентября). Разработанная методика валидна и пригодна для спектрофотометрического определения каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной. Рекомендуемый срок заготовки листьев по содержанию изучаемых групп БАВ, в целом, совпадает со сроками сбора плодов, так как последние являются широко востребованным фармакопейным ЛРС. Листья на данном этапе развития могут быть использованы как самостоятельное ЛРС для получения ЛРП.

## Литература (References)

1. Абдыкаликова К.А., Нечипоренко Л.П. Фитохимический состав надземной части облепихи крушиновидной // Естественные науки. – 2008. – №4. – С. 104-107. [Abdykalikova K.A., Nechiporenko L.P. *Estestvennye nauki*. Natural sciences. – 2008. – N4. – P. 104-107. (in Russian)]
2. Айтуарова А.Ш., Жусупова Г.Е. Выделение биологически активных веществ из надземной части растения вида *Hippophae rhamnoides* L. и возможности их использования в медицине. // Вестник КазНМУ. – 2016. – №3. – С. 195-197. [Aituarova A.Sh., Zhusupova G.E. *Vestnik KazNMU*. Bulletin of KazNMU. – 2016. – N3. – P. 195-197. (in Russian)]
3. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. – URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> [Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiiskoi Federatsii XIV izdaniya. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. – URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (in Russian)]
4. Ибрагимов З.Р., Гайтова Т.Р. Листья облепихи как источник БАВ // Актуальные проблемы химии, биологии и биотехнологии: материалы X всероссийской научной конференции: Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова, 2016. – С. 323-325. [Ibragimov Z.R., Gaitova T.R. *Aktual'nye problemy khimii, biologii i biotekhnologii: materialy X vserossiiskoi nauchnoi konferentsii*. Actual problems of chemistry, biology and biotechnology: materials of the X All-Russian Scientific Conference: North Ossetian State University. K.L. Khetagurova, 2016. – P. 323-325. (in Russian)]
5. Иванов Л.А., Иванова Л.А., Ронжина Д.А., Юдина П.К. Изменение содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях степных растений вдоль широтного градиента на Южном Урале // Физиология растений. – 2013. – Т.60, №6. – С. 856-864. [Ivanov L.A., Ivanova L.A., Ronzhina D.A., Yudina P.K. *Fiziologiya rastenii*. Plant Physiology. – 2013. – V.60, N6. – P. 856-864. (in Russian)]
6. Кароматов И.Д., Букаев М.К. Облепиха как адаптогенное, повышающее физическую силу лекарственное растение // Биология и интегративная медицина. – 2018. – №6. – С. 37-47. [Karomatov I.D., Bukaev M.K. *Biologiya i integrativnaya meditsina*. Biology and Integrative Medicine. – 2018. – N6. – P. 37-47. (in Russian)]
7. Ковалёва Н.А., Тринеева О.В., Сливкин А.И. Исследование состава пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) листьев облепихи крушиновидной методом ТСХ // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2022. – Т.22, №3. – С. 284-298. – DOI 10.17308/sorpchrom.2022.22/9335. [Kovaleva N.A., Trineeva O.V., Slivkin A.I. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. Sorption and chromatographic processes. – 2022. – V.22, N3. – P. 284-298. (in Russian)]
8. Кукина Т.П., Щербakov Д.Н., Генъш К.В. и др. Биоактивные комплексы древесной зелени облепихи *Hippophae rhamnoides* L. // Химия растительного сырья. – 2016. – №1. – С. 37-42. DOI: 10.14258/jcprm.2016011100. [Kukina T.P., Shcherbakov D.N., Gen'sh K.V. i dr. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. Chemistry of vegetable raw materials. – 2016. – N1. – P. 37-42. (in Russian)]
9. Кулешова Т.Э., Лихачев А.И., Павлова Е.С., Кулешов Д.О. и др. Взаимосвязь спектров поглощения пигментов растений и светодиодного освещения с различным спектральным составом // Журнал технической физики. – 2018. – Т.88, №9. – С. 1285-1289. [Kuleshova T.E., Likhachev A.I., Pavlova E.S., Kuleshov D.O. i dr. *Zhurnal tekhnicheskoi fiziki*. Journal of technical physics. – 2018. – V.88, N9. – P. 1285-1289. (in Russian)]
10. Мурзахметова М.К., Утегалиева Р.С., Аралбаева А.Н. и др. Исследование антиоксидантных и мембранопротекторных свойств экстрактов облепихи // Actualscience. – 2015. – Т.1, №5(5). – С. 26-28. [Murzakhmetova M.K., Utegalieva R.S., Aralbaeva A.N. i dr. *Actualscience*. Actualscience. – 2015. – V.1, N5(5). – P. 26-28. (in Russian)]
11. Нилова Л.П., Малютенкова С.М. Антиоксидантные комплексы облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) северо-запада России // Вестник ВГУИТ. – 2021. – Т.83, №1. – С. 108–114. doi:10.20914/2310-1202-2021-1-108-114. [Nilova L.P., Malyutenkova S.M. *Vestnik VGUIT*. Vestnik VSUIT. – 2021. – V.83, N1. – P. 108-114. (in Russian)]
12. Регистр лекарственных средств России. – URL: <https://www.rlsnet.ru/> [Registr lekarstvennykh sredstv Rossii. Register of medicines of Russia. – URL: <https://www.rlsnet.ru/> (in Russian)]



13. Тринеева О.В., Сливкин А.И., Сафонова Е.Ф. Определение гидрокислоричных кислот, каротиноидов и хлорофилла в листьях крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) // Химия растительного сырья. – 2015. – №3. – С.105-110. doi.org/10.14258/jcprm.201503522. [Trineeva O.V., Slivkin A.I., Safonova E.F. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. Chemistry of plant raw materials. – 2015. – N3. – P. 105-110. (in Russian)]
14. Фитохимическое исследование облепихи крушиновидной и лоха узколистного. // Лекарственные растения Северной Осетии семейства Elaeagnaceae: перспективы использования. – Владикавказ : Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова, 2015. – С. 81-103. [*Lekarstvennyye rasteniya Severnoi Osetii semeistva Elaeagnaceae: perspektivy ispol'zovaniya*. Medicinal plants of North Ossetia of the Elaeagnaceae family: prospects for use. - Vladikavkaz: North Ossetian State University. K.L. Khetagurova, 2015. – P. 81-103. (in Russian)]
15. Хасенова А.Б., Аралбаева А.Н., Утегалиева Р.С. и др. Облепиха крушиновидная (*Hippophae rhamnoides* L.) – источник биоактивных веществ // Вестник Алматинского технологического университета. – 2020. – №1. – С. 82-88. [Khasenova A.B., Aralbaeva A.N., Utegalieva R.S. i dr. *Vestnik Almatinskogo tekhnologicheskogo universiteta*. Bulletin of the Almaty Technological University. – 2020. – N1. – P. 82-88. (in Russian)]
16. Черняк Д.М., Титова М.С. Содержание каротина и витаминов Е и С в дальневосточных растениях. // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2015. – №2. – С. 92-93. [Chernyak D.M., Titova M.S. *Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal*. Pacific Medical Journal. – 2015. – N2. – P. 92-93. (in Russian)]
17. Шейченко О.П., Толкачев О.Н., Шевченко В.И. и др. Способ получения противовирусного препарата Гипорамин (варианты) // Патент РФ на изобретение №2197978. Опубликовано 10.02.2003. [Sheichenko O.P., Tolkachev O.N., Shevchenko V.I. i dr. *Sposob polucheniya protivovirusnogo preparata Giporamina (varianty)*. Method for producing the antiviral drug Hyporamine (options) // Patent of Russian Federation N2197978. Publication 10.02.2003. (in Russian)]
18. Geetha S., Sai Ram M., Mongia S.S., Singh V., Ilavazhagan G., Sawhney R.C. Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) on chromium (VI) induced oxidative stress in albino rats // Journal of Ethnopharmacology. – 2003. – N87(2-3). – P. 247-251.
19. 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. – N25(4). – P. 917.
20. Saggi S., Divekar H.M., Gupta V., Sawhney R.C., Banerjee P.K., Kumar R. Adaptogenic and safety evaluation of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaf extract: a dose dependent study // Food Chemical Toxicology. – 2007. – N45(4). – P. 609-617.
21. Suryakumar G., Gupta A. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) // Journal of Ethnopharmacology. – 2011. – N 138(2). – P. 268-278.
22. Upadhyay N., Gupta A. In vitro and dermal toxicity studies for Hippophae rhamnoides L. leaf extract // Toxicology Letters. – 2010. – N196. – P. 249.

### Информация об авторах

Ковалёва Наталья Александровна – аспирант, преподаватель кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет». E-mail: natali-sewer@yandex.ru

Тринеева Ольга Валерьевна – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет». E-mail: trineevaov@mail.ru

Колотнева Анастасия Игоревна – студентка фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет». E-mail: nastya.kolotneva.48@gmail.com

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

Поступила 15.09.2023

Принята к печати 15.10.2023